PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional

SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes 6 : C12N 15/29, 15/70, C07K 14/415, G01N 33/53, A61K 39/36 | A1

(11) Número de publicación internacional: **WO 98/59052**

(43) Fecha de publicación internacional: 30 de Diciembre de 1998 (30.12.98)

(21) Solicitud internacional: PCT/ES98/00175

(22) Fecha de la presentación internacional: 18 de Junio de 1998 (18.06.98)

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 9701390 24 de Junio de 1997 (24.06.97) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: INDUSTRIAL FARMACEUTICA Y DE ESPECIALIDADES, S.A. [ES/ES]; Alameda de Urquijo, 27, E–48008 Bilbao (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes *(sólo US)*: PALACIOS PELAEZ, Ricardo [ES/ES]; Carretera Tacoronte, 124–1°, E–38350 Tacoronte (ES). MARTINEZ QUESADA, Jorge [ES/ES]; Verdi, 256, E–08024 Barcelona (ES). MARTINEZ GARATE, Alberto [ES/ES]; José Miguel Barandiarán, 11–4° Izda., E–48980 Santurce (ES). ASTURIAS ORTEGA, Juan Andrés [ES/ES]; Tenor Constantino, 1–3° dcha., E–48003 Bilbao (ES).

(74) Mandatario: UNGRIA LOPEZ, Javier; Avenida Ramón y Cajal, 78, E–28043 Madrid (ES).

(81) Estados designados: CA, JP, US, Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publicada
Con informe de búsqueda internacional.
Con una indicación relativa a material biológico depositado, presentada de conformidad con lo dispuesto en la Regla 13bis, separadamente, y no con la descripción.

(54) Title: RECOMBINANT DNA WHICH CODES FOR EPITOPES OF THE PROFILINE ALLERGEN USEFUL FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF ALLERGIES

(54) Título: ADN RECOMBINANTE QUE CODIFICA PARA EPITOPOS DEL ALERGENO PROFILINA UTIL PARA EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE ALERGIAS

	PEPTIDE Péptido II (11→21)		PEPTIDE Péptido I (55→70)	PEPTIDE Péptido III (106→115)
Phleum pratense	MCEIEGH	HLAS.....	EPGHLAPTGMFVAGAK.....	.DEPMTPGQCH
Cynodon dactylon	-------	--T-	---F-----L-L-PT-	----------
Parietaria judaica	--DVD-N	T---	-A-F-----L-LG-T-	----------
Helianthus annuus	--D---TGQ	--T-	-A-T-------I----	---VA-----
Olea europaea	--D----EGHR-TA		---------LHLG-T-	E--V------

(57) Abstract

The molecules of recombinant DNA code for a polypeptide which has at least one epitope of the profiline allergen of plants selected from the group comprised of *Cynodon dactylon, Phleum pratense, Parietaria judaica, Helianthus annuus, Olea europaea* and *Mercuriales annua*. The polypeptide is obtained by cultivating a host organism containing the corresponding microbial expression vehicle. Application to the treatment and diagnosis of certain allergies.

(57) Resumen

Las moléculas de ADN recombinante codifican para un polipéptido que tiene al menos un epítopo del alérgeno profilina de plantas seleccionadas del grupo formado por *Cynodon dactilon, Phleum pratense, Parietaria judaica, Helianthus annuus, Olea europaea* y *Mercuriales annua*. El polipéptido se obtiene cultivando un organismo hospedador conteniendo el vehículo de expresión microbiano correspondiente. Aplicación en el tratamiento y diagnóstico de determinadas alergias.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Malí	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NZ	Nueva Zelandia	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PL	Polonia		
CM	Camerún	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
DK	Dinamarca	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonia						

ADN RECOMBINANTE QUE CODIFICA PARA EPITOPOS DEL ALERGENO PROFILINA UTIL PARA EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE ALERGIAS

CAMPO TECNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuadra en el campo del diagnóstico y tratamiento de alergias, particularmente alergias polínicas. Concretamente, trata del panalérgeno profilina, presente en un gran número de pólenes de plantas, y causante de numerosas reacciones cruzadas entre pólenes y con respecto a alimentos de origen vegetal. En la presente invención se obtienen moléculas de ADN recombinante que codifican para un polipéptido que tiene al menos un epitopo del alérgeno profilina, de una serie de plantas pertenecientes a los grupos de hierbas, malezas y árboles no fagales. En particular a las plantas *Cynodon dactylon*, *Phleum pratense*, *Parietaria judaica*, *Helianthus annuus*, *Olea europaea*, y *Mercurialis annua*. Todas ellas son plantas con amplia distribución en la Península Ibérica y los pólenes producidos por ellas se encuentran entre los agentes etiológicos de enfermedades alérgicas más importantes en dicho ámbito geográfico. Se describen también métodos de producción de estos polipéptidos recombinantes en sistemas de expresión heterólogos. También se describen eficientes métodos para la purificación de la profilina, tanto si es producida como proteína soluble o como insoluble.

ESTADO DE LA TECNICA ANTERIOR A LA INVENCIÓN

Las alergias de tipo I son un problema sanitario importante en los países industrializados. Este tipo de alergias estan causadas por la formación de anticuerpos IgE contra antígenos transportados por el aire. Estos anticuerpos IgE interaccionan con los mastocitos y basófilos, liberando mediadores biológicos como histamina, produciendo rinitis alérgica, conjuntivitis y asma bron-

quial en un 20% de la población [(1) Miyamoto, T. (1991). Advances in Allergology and Clinical Immunology. P. Godard, J. Bousquet, and F. Michel, eds. (New Jersey, USA: The Parthenon Publishing Group-Carnforth), pp. 343-347]. Uno de los métodos actuales para remediar las manifestaciones alérgicas es la inmunoterapia. Este método consiste básicamente en modular la respuesta inmune en el paciente mediante la administración regular y en concentraciones crecientes de las proteínas que producen la alergia (extractos alergénicos).

Los métodos de diagnóstico de las enfermedades alérgicas, tales como RIA (immuno-radiometric asssay), RAST (radio-allergosorbent test), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), inmunotransferencia, ensayos de liberación de histamina, entre otros, dependen de la disponibilidad de alérgenos puros. Los extractos alergénicos aislados de fuentes naturales son complejas mezclas de proteínas y otras moléculas. Su composición, y por lo tanto alergenicidad, depende del material usado, el cual varía según las condiciones ambientales, en el caso de los pólenes, la fase de maduración, en el caso de los hongos, las condiciones de crecimiento de los ácaros, etc. Incluso, algunos extractos pueden contener una concentración insuficiente de alérgenos mayores, pueden estar contaminados con componentes no deseados, frente a los cuales el paciente no es alérgico, o ambos. Además, alérgenos importantes pueden perderse durante la extracción debido a proteasas, y los procesos bioquímicos de purificación de alérgenos son laboriosos y costosos. Por estas razones, se ha prestado gran atención a la tecnología del ADN recombinante como una alternativa viable para la producción de alérgenos recombinantes, facilitando así su caracterización a nivel molecular, y su uso en diagnóstico y terapia [(2) Scheiner, O. and Kraft, D. (1995). Basic and

practical aspects or recombinant allergens. Allergy 50, 384-391]. Los alérgenos recombinantes pueden ser producidos a gran escala en tanques de fermentación, utilizando sistemas de expresión microbianos. Su purificación es más eficiente y barata, ya que se parte de una mayor proporción de la proteína de interés. Además, mediante estas técnicas se pueden obtener fácilmente fragmentos específicos de estas proteínas. La aplicación de las técnicas del ADN recombinante ha llevado al aislamiento de un gran número de proteínas con características alergénicas [(3) Stewart, G. (1995). The molecular biology of allergens. In Asthma and Rhinitis. W. Busse and S. Holgate, eds. (Boston: Backwell Scientifics Publications), pp. 898-932].

Las profilinas constituyen una ubicua familia de proteínas implicadas en la unión a actina, y que se encuentran en el citoesqueleto de organismos eucariótas [(4) Haarer, B. and Brown, S. (1990). Structure and function of profilin. Cell Motility and the Cytoskeleton 17, 71-74; y (5) Theriot, J.A. and Mitchison, T.J. (1993). The three faces of profilin. Cell 75, 835-838]. Otras funciones adicionales de la profilina han sido reseñadas con anterioridad en la literatura [(6) Machesky, L. and Pollard, T. (1993). Profilin as a potencial mediator of membrane-cytoskeleton communication. TIBS 3, 381-385; y (7) Aderen, A. (1992). Signal transduction and the actin cytoskeleton. TIBS 17, 438-443]. Las profilinas son prominentes alérgenos que pueden ser aislados de pólenes de árboles, hierbas y malezas, así como de algunos alimentos [(8) Valenta, R., Duchêne, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., Ferreira, F., Tejkl, M., Edelmann, H., Kraft, D., and Scheiner, O. (1992). Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. J. Exp. Med. 175, 377-385; (9) Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breiteneder, H., Valenta, R., Ebner, H., Kraft, D., and Scheiner, O. (1995).

Allergens, IgE, mediators, inflammatory mechanisms. J. Allergy Clin. Immunol. 95, 962-969; (10) Valenta, R., Duchêne, M., Pettenburger, K., Sillaber, C., Valent, P., Bettelheim, P., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., and Scheiner, O. (1991). Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. Science 253, 557-560; (11) van Ree, R., Fernández-Rivas, M., Cuevas, M., van Wijingaarden, M., and Aalberse, R. (1995). Pollen-related allergy to peach and apple: An important role for profilin. J. Allergy Clin. Immunol. 95, 726-734; y (12) Vieths, S., Jankiewicz, A., Wütrich, B., and Baltes, W. (1995). Immunoblot study of IgE binding allergens in celery roots. Ann. Allergy Asthma Immunol. 75, 48-55]. Se ha encontrado que pacientes alérgicos a profilina constituyen el 20% de individuos alérgicos a polen [(8)]. Estudios posteriores detectaron reactividad de la profilina de polen de girasol en el 28% de los sueros de pacientes alérgicos a esta planta compuesta [(13) Jiménez, A., Moreno, C., Martínez, J., Martínez, A., Bartolomé, B., Guerra, F., and Palacios, R. (1994). Sensitization to sunflower pollen: only an occupational allergy? Int. Arch. Allergy Immunol. 105, 297-307]. La disponibilidad de este panalérgeno como una proteína recombinante permitiría la caracterización a nivel molecular las regiones implicadas en las reacciones antigénicas, y su uso en diagnóstico y tratamiento de pacientes alérgicos.

El banco de datos SWISS-Prot contiene un gran número de secuencias que codifican para profilinas, de las cuales sólo 10 pertenecen a 6 especies de plantas relacionadas con procesos alérgicos. Estas profilinas clonadas proceden de *Betula verrucosa* (abedul), llamada Bet v 2 [(10)]; *Triticum aestivum* (trigo), clonadas tres isoformas [(14) Rihs, H., Rozynek, P., May-Taube, K., Welticke, B.,

and Baur, X. (1994). Polymerase chain reaction based cDNA cloning of wheat profilin: a potential plant allergen. Int. Arch. Allergy Immunol. 105, 190-194]; *Phleum pratense* [(15) Valenta, R., Ball, T., Vrtala, S., Duchêne, M., Kraft, D., and Scheiner, O. (1994). cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 199, 106-118]; *Zea mays* (maíz), clonadas tres isoformas [(16) Staiger, C., Goodbody, K., Hussey, P., Valenta, R., Drobak, B., and Lloyd, C. (1993). The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. Plant J. 4, 631-641]; *Phaseolus vulgaris* (alubia) [(17) Vidali, L., Pérez, H.E., Valdés, V., Noguez, R., Zamudio, F., and Sánchez, F. (1995). Purification, characterization, and cDNA cloning of profilin from *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol. 108, 115-123], y *Hordeum vulgare* (cebada) (número de acceso a EMBL Data Bank: U49505).

En el presente estudio se han clonado por primera vez distintas secuencias, que codifican para profilinas de las siguientes especies: *Cynodon dactylon*, *Phleum pratense*, *Parietaria judaica*, *Helianthus annuus*, *Olea europaea* y *Mercurialis annua* . Estas secuencias codifican para unos polipéptidos de unos 14 kDa, identificados como profilinas en base a: i) Gran similaridad con otras profilinas estudiadas. ii) Reactividad frente a sueros obtenidos de conejos inmunizados con profilina purificada a homogeneidad de *Helianthus annuus*. iii) Capacidad de unirse a poli-L-prolina. iv) Reactividad con IgE de sueros de pacientes alérgicos a profilinas. Igualmente se presentan resultados sobre la reactividad cruzada de la profilina con alérgenos comunes relacionados y no relacionados filogenéticamente.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La invención, tal y como se indica en su enunciado se refiere a moléculas de ADN recombinante que codifican para epítopos del alérgeno profilina de *Cynodon dactylon*, *Phleum pratense*, *Parietaria judaica*, *Helianthus annuus*, *Olea europaea* y *Mercurialis annua*; y a su aplicación para el diagnóstico y tratamiento de alergias.

Descripción de las plantas utilizadas como materia prima

La clonación de la profilina se ha realizado del polen de plantas del tipo hierbas, malezas o árboles. La calidad de los pólenes ha sido controlada para que no contuvieran más del 0.1% de pólenes contaminantes u otras partes de la planta o fragmentos vegetales. Las plantas de las cuales proceden los pólenes son las siguientes:

* Las gramíneas (hierbas), pertenecientes a la Familia *Gramineae*, concretamente:

-*Cynodon dactylon*, llamada en inglés "Bermuda grass", y que pertenece a la subfamilia *Panicoideae* y tribu *Chlorideae*.

-*Phleum pratense*, llamada en inglés "timothy grass", y que pertenece a la subfamilia *Pooideae*, grupo *Festuciformes* y tribu *Festuceae*.

* Las malezas:

-*Parietaria judaica*, llamada en inglés "wall pellitory", y que pertenece a la familia *Urticacea*.

-*Helianthus annuus*, llamada en inglés "sunflower", y que pertenece a la familia *Compositae*, subfamilia *Tubiliflorae*, y tribu *Heliantheae*.

-*Mercurialis annua*, que pertenece a la familia *Euphorbiaceae*

* El árbol, *Olea europaea*, llamado en inglés "olive tree", perteneciente a la familia *Oleaceae*.

Clonación y secuenciación de genes que codifican para profilinas

La clonación de genes puede realizarse utilizando diversos métodos [(18) Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratoy]: bibliotecas de ADN genómico o ADN complementario, utilizando como vectores: plásmidos, fásmidos, bacteriófagos o cósmidos. También se puede utilizar la técnica de PCR (amplificación en cadena de la ADN polimerasa) para clonar un gen del cual se conoce parte de su secuencia. De igual manera la detección de los clones que portan el gen de interés puede realizarse utilizando diferentes técnicas: complementación de mutantes auxótrofos, inmunodetección o actividad enzimática de la proteína expresada, radiodetección con sondas de oligonucleótidos marcadas radiactivamente, o secuenciación directa. En la presente invención se han conjugado los dos métodos más directos de ambas etapas: la clonación mediante la amplificación por PCR de ADN complementario y la secuenciación directa de los insertos clonados.

A partir de 100 mg de polen de diversas fuentes, se aisló el ARN mensajero enriquecido en transcritos con poli(A+) utilizando columnas de afinidad. Se sintetizó la primera cadena de ADN complementario a partir del ARN mensajero aislado, utilizando transcriptasa reversa. El híbrido de ADN-ARN obtenido se utilizó como molde para la amplificación de los correspondientes genes de la profilina. En este proceso se utilizaron como cebadores oligonucleótidos degenerados, obtenidos por comparación de la secuencia de aminoácidos de todas las profilinas vegetales descritas en el apartado de "estado de la técnica". A estos cebadores se les añadió en sus extremos secuencias de reconocimiento de diversas endonucleasas de restricción. La

amplificación por PCR se realizó a temperaturas de hibridación de entre 42-56°C y durante 30-35 ciclos. La reacción se sometió a electroforesis en geles de agarosa (2%) y una banda de unos 400 pares de bases (pb) fue aislada del gel y purificada. El ADN purificado se digirió con las endonucleasas de restricción *Eco*RI y *Hind*III, y se ligó al vector pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), cortado con los mismos enzimas. Células competentes de *E. coli* DH5a se transformaron con la mezcla de ligación y los transformantes se seleccionaron en placas de medio sólido LB con ampicilina, X-gal e IPTG. El ADN plasmídico de los clones resistentes a ampicilina, y que tenían color blanco fue aislado, y caracterizado mediante digestión con endonucleasas de restricción. El ADN insertado, cuyo tamaño correspondia con el esperado, fue secuenciado mediante el método de Sanger [(19) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467] utilizando dideoxinucleótidos fluorescentes. El análisis informático de las secuencias demostró que todas las secuencias codificaban para la profilina, y que existía una gran homología con otras profilinas descritas.

Expresión de los genes clonados

Existe una gran diversidad de sistemas de expresión de proteínas heterólogas. En la presente invención se ha sobreexpresado el gen de la profilina para formar una proteína no fusionada utilizando el vector de expresión pKN172 [(20) Way, M., Pope, B., Gooch, J., Hawkins, M., and Weeds, A.G. (1990). Identification of a region in segment 1 of gelsolin critical for actin binding. EMBO J. 9, 4103-4109]. La expresión en este plásmido se basa en la interacción de la ARN polimerasa del fago T7 con un promotor específico del mismo fago (promotor del gen f10), que es colocado delante del fragmento que queremos expre-

sar. La expresión de la ARN polimerasa de T7, en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) [(21) Studier, F.M. and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189, 113-130], se induce con IPTG, lo cual desencadena la expresión final del gen de interés. El IPTG se añadió, a concentraciones entre 0.6-1 mM, a un cultivo crecido en medio nutritivo (LB ó TB) con ampicilina (100-200 mg/ml), a una densidad óptica a 600 nm de entre 0.6 -1. Esta adición provoca la expresión del gen de la profilina clonado detrás del promotor del gen f10. El cultivo se recogió entre 3-6 horas después de la inducción.

Purificación de la profilina recombinante

El método de purificación de la profilina se basa en la capacidad que ésta tiene para unirse a cadenas de L-prolina. La purificación se realizó en un sólo paso mediante cromatografía de afinidad en columna de Sepharose-poli-L-prolina, según describe Lindberg [(22 Lindberg, U., Schutt, C., Hellsten, E., Tjäder, A., and Hult, T. (1988). The use of poly(L-proline)-Sepharose in the isolation of profilin and profilactin complexes. Biochim. Biophys. Acta 967, 391-400]. Esta resina es una agarosa comercial (Pharmacia Biotech) activada con bromuro de cianógeno (CNBr) a la cual se unen covalentemente péptidos de prolina (Poli-L-prolina) de al menos 5 kDa. Cúando la proteína recombinante no está en forma soluble se debe tratar con 8 M de urea o una mezcla de los detergentes sarcosil/triton X-100, para que pueda ser aplicada a la columna de Sepharose-poli-L-prolina. La profilina pegada específicamente a esta resina, es eluída de la columna mediante 6 M urea, y dializada extensivamente. De esta forma se obtiene una profilina recombinante de gran pureza (>95%) y en grandes cantidades (10-50 mg/litro de cultivo).

Aislamiento de la profilina de girasol (*Helianthus annuus*) y su secuenciación proteica

Se purificó la profilina de girasol (*Helianthus annuus*) mediante cromatografía resolutiva desarrollada en dos fases. La proteína así purificada fue identificada como profilina mediante ensayos fisiológicos (unión con poly-L-prolina), bioquímicos (parámetros moleculares y secuencia de aminoácidos) e inmunoquímicos (SDS-PAGE Immunoblottings). Se obtuvieron pesos moleculares de 15.7 kDa en SDS-PAGE y de 19.1 kDa en cromatografía SMART™ (lo que indica su naturaleza monomérica), así como un pI de 4.5-4.4 (tres isoformas). Se determinó la composición de aminoácidos y la secuencia parcial de la proteína purificada. Seis péptidos internos que fueron secuenciados confirman su identidad profilínica y muestran el mayor grado de similitud con los péptidos de polen de *Zea mays* y semilla de *Phaseolus vulgaris*. Con el fin de evaluar la presencia de proteínas de naturaleza profilínica en un grupo de aeroalérgenos y alérgenos alimentarios, se obtuvo y empleó un antisuero policlonal anti-profilina. Estos resultados se discuten de modo preliminar.

En resumen, esta invención proporciona ADN recombinante que codifica para profilina de un gran número de plantas, tanto hierbas, malezas y árboles. Igualmente proporciona un sistema de expresión microbiano (*E. coli*) para la obtención de grandes cantidades de profilina. Esta expresión puede realizarse en otros sistemas microbianos (*Pseudomonas*, *Bacillus*) o eucarióticos (levaduras o células de insectos). La profilina producida puede ser procesada por tres métodos diferentes, para finalmente ser purificada mediante un sólo paso de cromatografía de afinidad en Sepharose-poli-L-prolina. La profilina purificada por este método no difiere en sus propiedades de unión a IgE de las profilinas naturales. Igualmente se describe la purifica-

ción y caracterización completa de la profilina de girasol (*Helianthus annuus*).

Aplicaciones

Los métodos de diagnóstico, tanto in vitro como in vivo, que actualmente se utilizan se basan en el uso de extractos de alérgenos. Debido a la dificultad de obtener lotes reproducibles de extractos alergénicos, y a que algunos alérgenos menores, como la profilina estan poco representados o parcialmente degradados [(23) Susani, M., Jertschin, P., Dolecek, C., Sperr, W., Valent, P., Ebner, C., Kraft, D., Valenta, R., and Scheiner, O. (1995). High level expression of birch pollen profilin (Bet v 2) in *Escherichia coli*: purification and characterization of the recombinant allergen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 215, 250-263], es interesante el uso de preparaciones reproducibles de alérgenos puros obtenidos mediante la tecnología de ADN recombinante [(2)]. Actualmente se pueden realizar diagnósticos precisos de ciertos tipos de alergias utilizando un número definido de alérgenos recombinantes. La caracterización del patrón de reactividad de cada paciente puede conducir en un futuro próximo, al desarrollo de un tipo de inmunoterapia más individualizada, y por ello eficiente. Los alérgenos recombinantes, profilinas, descritos en esta invención, permiten el diagnóstico de alergias polínicas en las cuales se encuentra implicada la profilina, que son aproximadamente un 20% del total de alergias a polen [(8)].

Los ADN recombinantes que codifican para los alérgenos profilínicos objeto de la presente invención pueden servir no sólo para la obtención de alérgenos recombinantes útiles para el diagnóstico y tratamiento convencional de alergias, sino también para dos potenciales usos:

a) Producción de péptidos a partir de dichos alérgenos, que constituyan epítopos de células T, y

que por tanto puedan ser vacunas con actividad anergizante (supresora de respuesta Th2).

b) Obtención de isoformas recombinantes mutantes que no den lugar a fijación de IgE, y que por tanto constituyan tratamientos con reducida capacidad de producción de efectos adversos.

DEPOSITO DE LAS CEPAS

Las cepas más importantes que se mencionan en la presente solicitud han sido depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, 46100 Burjasot, Valencia) correspondiéndoles los siguientes nos. de orden:

Escherichia coli	CdPRO1---	CECT 4872
Escherichia coli	PjPRO1---	CECT 4873
Escherichia coli	OePRO1---	CECT 4874
Escherichia coli	MaPRO1---	CECT 4875
Escherichia coli	HaPRO2---	CECT 4876
Escherichia coli	PpPRO3---	CECT 4877

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie del proceso de purificación de la profilina CdPRO1 de *Cynodon dactylon*. Carriles 1 y 2, lisado de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo pKN172 sin inserto y con el inserto CdPRO1, respectivamente; carriles 3 y 4, fracciones insoluble y soluble de la muestra del carril 2, respectivamente; carril 5, fracción no retenida en la columna Sepharose-PLP; carril 6, profilina recombinante purificada como elución de urea 6M de la columna de Sepharose-PLP; carril 7, profilina natural purificada.

Figura 2: PAGE teñida con azul de Coomassie del proceso de purificación de la profilina OePRO1 de *Olea europaea*. Carriles 1 y 2, lisado de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo pKN172 sin inserto y con el inserto OePRO1, respectivamente; carriles 3 y 4, fracciones insoluble y soluble de la muestra del carril 2, respectivamente; carril

5, fracción no retenida en la columna Sepharose-PLP; carril 6, lavado de la columna con 2 M de urea; carril 7, profilina recombinante purificada como elución de urea 6M de la columna de Sepharose-PLP; carril 8, profilina natural purificada.

Figura 3: SDS-PAGE teñida con plata de la profilina purificada CdPRO1 de *Cynodon dactylon*. Carriles 1 y 4, profilina recombinante purificada por Sepharose-PLP, 3 y 0.5 mg, respectivamente; carril 2, profilina natural purificada; carril 3, lisado de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo pKN172 con el inserto CdPRO1.

Figura 4: Inmunodetección de profilina recombinante de *Cynodon dactylon* utilizando anticuerpos policlonales anti-profilina. La descripción del gel es idéntica a la descrita en la figura 1.

Figura 5: Inmunodetección de profilina recombinante de *Olea europaea* utilizando anticuerpos policlonales anti-profilina. La descripción del gel es idéntica a la descrita en la figura 2.

Figura 6: Comparación por inmunodetección de la ractividad de IgE procedente de suero de pacientes alérgicos a *Cynodon dactylon* o gramíneas. Se transfirieron proteínas del extracto de *Cynodon dactylon* (E) y profilinas recombinantes purificadas (R y P) y se incubaron con sueros de pacientes (1-8) alérgicos a *Cynodon dactylon*, pool de sueros de alérgicos a gramíneas (G) y de individuos sanos (C).

Figura 7: Inhibición de inmunodetección. Extractos proteicos (E), profilina natural purificada (P) y recombinante purificada (R) de *Cynodon dactylon* se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Estas membranas se incubaron con un pool de sueros de pacientes alérgicos a *Cynodon dactylon* inhibidos con 10 mg de profilina recombinante (c) o BSA (b) por ml de suero, o

sin inhibir (a). Como control se utilizó un pool de sueros de individuos sanos (c).

Figura 8: Simulación de la estructura tridimensional de la profilina PpPRO3 de *Phleum pratense* y localización de las diferentes regiones en las que se enmarcan los péptidos antigénicos propuestos.

Figura 9: Estructura de los tres péptidos con mayor posibilidades de antigenicidad. La numeración corresponde a la secuencia de aminoácidos en PpPRO3 de *Phleum pratense*.

Figura 10: SDS-PAGE de la fracción de profilina eluída tras la cromatografía de afinidad (carril 2), extracto completo de polen de girasol (carril 3) y el mismo extracto desprovisto de la fracción de profilina (carril 1).

Figura 11: Cromatografía de SMART realizado mediante gel filtración en columna Superdex 75 PC3.2/30 correspondiente a la fracción de profilina de *Helianthus annuus* obtenida por cromatografía de afinidad.

Figura 12: IEF (pH 3-10) de profilina obtenida tras cromatografía de filtración en gel.

Figura 13: Secuencia de aminoácidos deducida (HaPRO1, HaPRO2, HaPRO3, HaPRO4, HaPRO5 y HaPRO6) de *Helianthus annuus*. Los guiones indican que la secuencia es idéntica a la mostrada en la parte superior. En negrita se indican los resultados de la secuenciación parcial de la profilina purificada de *H. annuus*; los asteriscos indican que la secuencia es idéntica a la mostrada en la parte superior.

Figura 14: Inmunodetección de profilina purificada de girasol incubada con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a polen de gramíneas (carril 1), de girasol (carril 2) y frutos de *Rosaceas* (carril 3).

Figura 15: Inmunodetección de extracto de polen de abedul (carril 1) y extractos de piel de manzana (carril 2), de melocotón (carril 3) y pera (carril 4), incubados con antisuero anti-profilina de girasol.

Figura 16: Inmunodetección de extracto de polen de girasol (carril 1), *Phleum pratense* (carril 2), caspa de perro (carril 3), *Parietaria judaica* (carril 4), *Dermatophagoides pteronyssinus* (carril 5), *Olea europaea* (carril 6), *Mercurialis* annua (carril 7), *Alternaria alternata* (carril 8), *Aspergillus fumigatus* (carril 9), *Penicillium notatum* (carril 10), y estambres de azafrán (carril 11), incubados con antisuero anti-profilina de girasol.

MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención puede ser entendida a partir de los siguientes ejemplos, que no deben considerarse en absoluto limitativos de la misma.

Técnicas básicas de la tecnología del ADN recombinante y bioquímica

Como muchas de las técnicas de ADN recombinante empleadas en esta invención son utilizadas rutinariamente por personal cualificado en el tema, es mejor introducir una corta descripción de estas técnicas más que describirlas cada vez que se utilicen. Excepto donde existe una indicación específica, todos estos protocolos están descritos en la referencia [(18)].

Aislamiento de plásmidos para su secuenciación

Protocolo modificado del descrito en Sambrook et al, páginas 1.21 a 1.41. Un cultivo de 15 ml de *E. coli*, crecido en LB con ampicilina (100 mg/ml) durante 16 horas a 37°C, se recogió por centrifugación. Las células se resuspendieron en 1 ml TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 2 ml de solución de lisis (0.2 N NaOH, 1% SDS), manteniendose en hielo 5 min. Se añadieron 1.5 ml de acetato potásico 3 M pH 4.8, agitándose por inversión, y se incubó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 4000 xg y 4°C. El sobrenadante se pasó a otro tubo al que se añadieron 9 ml de

estanol, incubandose durante 20 minutos. Se centrifugo en las mismas condiciones, y el precipitado se lavó con etanol al 70%, y se secó. Este ADN se resuspendió en 200 ml de 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA y 100 mg/ml de ARNasa y se siguió purificando según el protocolo Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI). El ADN así obtenido se resuspendió en 50-80 ml de agua destilada estéril, y se guardó a -20°C.

Corte con endonucleasas de restricción

Una reacción contiene típicamente entre 50-500 mg/ml de ADN en el tampón de reacción recomendado por los fabricantes (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia; Boehringer-Mannhein, Mannhein, Alemania; Promega). Se añaden de 2 a 5 unidades de la endonucleasa de restricción por cada mg de ADN y la reacción se incuba de 1 a 3 horas a las temperaturas recomendadas por el fabricante. La reacción se para calentando a 85°C durante 10 min, o por extracción con fenol seguida de precipitación de ADN con etanol. Esta técnica está descrita también en las páginas de 5.28 a 5.32 de la referencia [(18)].

Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos de ADN de geles

La electroforesis en geles de agarosa se realizó en un aparato horizontal, utilizando como tampón Tris-borato, como se describe en las páginas 6.3 a 6.15 de la referencia [(18)]. Los fragmentos de ADN se tiñeron utilizando 0.5 mg/ml de bromuro de etidio que se añadió al gel. El ADN se visualizó por iluminación ultravioleta entre 300 y 310 nm. Para purificar fragmentos de ADN de la agarosa se utilizó el kit de Geneclean (Bio101 Inc., La Jolla, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ligación de fragmentos de ADN

Para la ligación de fragmentos de ADN con extremos cohesivos complementarios, 100 ng de cada uno de los fra-

gmentos se incubaron en un volumen de reacción de 10 a 20 ml conteniendo unas 0.5 unidades de T4 ADN ligasa (BioLine, London, UK) en el tampón recomendado por el fabricante. La incubación se llevó a cabo durante 15 horas a 12-15°C, o 7 horas a 20°C.

Transformación de *E. coli* con ADN

Las cepas de *E. coli* DH5a o BL21 (DE3) fueron utilizadas en la mayoria de los experimentos. El ADN fue introducido mediante el protocolo del cloruro calcico, como se describe en [(18)], páginas de 1.76 a 1.84, o mediante el método del cloruro de rubidio, como describe Hanahan [(24) Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580]. La selección se realizó en LB sólido con ampicilina (100 mg/ml) y cuando fue necesario se añadieron a cada placa de Petri: 40 ml de X-gal (20 mg/ml en dimetilformamida), y 4 ml de IPTG (200 mg/ml).

Muestreo de plásmidos en *E. coli*

Después de la transformación, las colonias resultantes de *E. coli* fueron estudiadas para detectar la presencia de los plásmidos deseados mediante un protocolo rápido de aislamiento de plásmidos. Este protocolo esta descrito en las páginas 1.25 a 1.28 de la referencia de Sambrook [(18)].

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Se siguió básicamente la técnica descrita por Laemmli [(25) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assambly of the head of bacteriophage T_4. Nature 277, 680-685], utilizando un aparato de electroforesis MINI-PROTEAN (Bio-Rad, Hercules, CA). Los geles, de 10 x 10 cm y con una concentración de poliacrilamida del 12.5 o 15%, se sometieron a una corriente de 200 voltios durante 45 minutos en tampón Tris-Glicina. Las proteínas utilizadas

como patrones fueron las del kit Bio-Rad para bajos pesos moleculares. El cálculo de los pesos moleculares y los análisis densitométricos de los geles se realizó utilizando un analizador de image (Bio-Image, Millipore Corp, Bedford, MA).

Análisis por immunotransferencia

Se realizó por el método de Shen y cols. con modificaciones [(26) Shen, H., Choo, K., Lee, H., Hsieh, J., Lin, W., Lee, W., and Han, S. (1991). The 40-kilodalton allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies. Clin. Exp. Allergy 21, 675-681]. Las proteínas separadas en SDS-PAGE fueron electro-transferidas a membranas de nylon. La membrana es incubada con un agente bloqueante (como puede ser leche desnatada al 5% en PBS: al cual llamaremos a partir de ahora leche/PBS). La membrana es entonces incubado con los anticuerpos de interés durante varias horas (estos anticuerpos podrán provenir de pacientes o de animales immunizados). Posteriormente, la membrana se lava varias veces con leche/PBS, y se incuba con un segundo anticuerpo comercial, al cual esta acoplada una enzima (por ejemplo peroxidasa). Este anticuerpo comercial será anti-IgG, en el caso que hayamos utiizado un animal immunizado, o anti-IgE, si el suero proviene de humanos. La membrana es nuevamente lavado en PBS, y teñido con 4-cloro-1-naftol al 0,06% en PBS con H_2O_2 al 0.01%, a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción es parada con agua destilada.

Preparación de la columna de Sepharosa poli-L-prolina

El primer paso en la purificación de la profilina se realizó mediante cromatografía de afinidad en la columna de Sepharosa activada con CNBr y acoplada a PLP, de acuerdo con Lindberg et al. [(22)]. Este método, en resumen, consiste en humedecer 2 g de Sepharose 4B activada con CNBr

(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) en 100 ml de HCl 1mM durante 15 minutos. A continuación, la resina fue lavada a través de un embudo filtrante (porosidad G3) al que se añadió cuatro veces consecutivas 100 ml de HCl 1mM. El gel resultante (unos 7 ml) fue resuspendido en el tampón ($KHCO_3$, 0.1 M, pH 8.3, KCl 0.5 M); después, se disolvieron 30 mg de Poly-L-proline (PLP, Mr 5000, INC Biochemicals, Aurora, OH, USA) en 2 ml de agua destilada durante 12 h. El material no soluble fue eliminado y el sobrenadante añadido a la resina suspendida en el tampón de acoplamiento. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 2 h. El bloqueo de los grupos activos se realizó filtrando la resina y resuspendiéndola en 10 ml de Glicina 0.5 M, pH 8.5. Seguidamente se procedió al lavado del exceso de ligando con tampón de acetato 0.1 M, pH 4.0 y PBS pH 8.3 ambos conteniendo NaCl 0.5 M. El exceso de agente bloqueante se eliminó por lavado con PBS. Con el conjugado de PLP-Sepharose obtenido se montó una columna de 1x 24 cm equilibrada con PBS.

Agarosa-isoelectroenfoque (IEF)

Esta técnica se realizó utilizando placas de Agarosa Isogel (FMC Bio Products, Rockland, Maine), en el intervalo de pH 3 - 10. Se aplicaron 20 mg de proteína por calle. El punto isoeléctrico (pI) de las moléculas en cuestión fue determinado comparando su migración con la de un conjunto de proteínas de pI conocido. El esquema electroforético obtenido se evaluó por análisis de imagen en el sistema BIO-IMAGE (Millipore, Bedford, Mass. USA).

Ejemplos relacionados específicamente con la invención

Aislamiento de ADN poli (A+) de polen

Se aisló el ARN poli (A+) de 100 mg de polen siguiendo el protocolo descrito en Quick Prep Micro mRNA Purification Test (Pharmacia Biotech). El ARN purificado se resuspendió en 400 ml de agua destilada tratada con dietilpirocarbona-

to, y se determinó su concentración a 260 nm. A partir de 100 mg de polen se obtuvieron unos 8 mg de ARN, que se guardaron a -20°C precipitados con etanol. Este ARN poli (A+) fue utilizado para realizar la sintesis de la primera cadena de ADN complementario, como se expone en apartado siguiente.

Síntesis de la primera cadena de ADN complementario

Un mg de ARN poli (A+) obtenido según el apartado siguiente, fue sedimentado por centrifugación a 4°C a 14000 xg durante 30 min. El sobrenadante se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 20 ml de agua destilada tratada con dietilpirocarbonato. La solución se calentó a 60°C durante 10 min y luego se enfrió en hielo. Posteriormente, se siguió el protocolo descrito en First-Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia Biotech), salvo que la incubación con la transcriptasa reversa se realizó durante 70 minutos. El cebador utilizado fue la mezcla al azar de hexadeoxinucleótidos, llamado pd(N6)primer (Pharmacia Biotech). Una vez acabada la reacción, la mezcla se calentó a 90°C durante 5 minutos y se enfrió en hielo, almacenándose posteriormente a -20°C hasta que fue utilizada para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como se explica en el apartado siguiente.

Amplificación del gen de profilina por PCR

Los cebadores utilizados de la PCR fueron obtenidos de comparar diversas secuencias de profilinas de plantas, y teniendo en cuenta la degeneración del código genético:

* PROEXF (extremo 5´ del gen):

AGAGAATTCCATATGTCGTGGCA(A/G)(A/G)CGTACGT

* PROEXR (extremo 3´ del gen):

AGAAAGCTT(C/T)TACA(G/T)GCC(C/T)TGTTC(G/A/T)A(G/T/C)(G/A/C)AGGTA

Los cebadores se componen de la zona de hibridación (subrayada), de varios sitios de corte para las endonucleasas de restricción, *Eco*RI, *Hind*III y *Nde*I, (en negrita), y

de unos nucleótidos de anclaje. Todos los nucleótidos entre paréntesis están en proporciones equimoleculares en esa determinanda posición.

La reacción de amplificación por PCR del gen de la profilina tenía los siguientes componentes en un volumen de reacción de 50 ml: tampón de amplificación x10, 5 ml; 200 mM de dNTPs; 100 pmoles de cada oligonucleótido cebador degenerado; 2,5 unidades de Taq polimerasa (Bioline, London, ,UK); 5 ml reacción de ADN complementario obtenido según el ejemplo II y agua destilada estéril hasta 50 ml. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador RoboCycler (Stratagene) en las siguientes condiciones: 4 min a 94°C, seguido de 5 ciclos compuestos de 1 min a 94°C, 2 min a 42°C y 2 min a 72°C. Posteriormente, se realizaron otros 30 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 56°C y 2 min a 72°C de amplificación. Se concluyó con una extensión de 6 minutos a 72°C. El producto de la reacción fue sometido a electroforesis en geles de agarosa (2%). La banda de 400 pb que correspondía a la profilina fue aislada del gel por Geneclean (Bio101, La Jolla, CA), utilizando el protocolo descrito por el fabricante.

Clonación del gen de profilina en pBluescript

El fragmento aislado fue digerido con *Hin*dIII, y posteriormente con *Eco*RI, y las endonucleasas de restricción se inactivaron por calor. Estos fragmentos se ligaron al vector pBluescript digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación se utilizó para transformar transformar células competentes de *E. coli* DH5a. La selección se realizó realizó en medio LB con ampicilina, X-Gal e IPTG, como se describe en Sambrook y col [(18)]. Las colonias resultantes, que en este medio presentaban un color blanco, fueron crecidas para aislar su ADN plasmídico, el cual fue digerido simultáneamente con *Eco*RI-*Hin*dIII, y *Nde*I-*Hin*dIII.

Los clones que, en ambos casos, liberaban un fragmento de 400 pb fueron seleccionados para su posterior análisis.

Secuenciación del gen de profilina

La secuenciación del ADN insertado el pBluescript se realizó basándose en el método de Sanger [(19)] modificado para ser utilizado con dideoxinucleótidos fluorescentes y amplificación en termociclador. El ADN a secuenciar se preparó de la siguiente forma: cultivos de *E. coli* DH5a, conteniendo los plásmidos de interés fueron crecidos en 15 ml de LB suplementado con 100 mg/ml de ampicilina, durante 16 horas, a 37°C y con agitación. El ADN se aisló por el método descrito en el apartado A). Las reacciones de secuenciación se realizaron mezclando 700-1000 ng de molde, 25 pmoles del cebador y los reactivos indicados en el kit de secuenciación (PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Termination Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer) siguiendose las instrucciones del fabricante. Todos los fragmentos fueron secuenciados en las dos direcciones, utilizando cebadores comerciales (M13 -20 primer o reverse primer) o cebadores específicos.

Se secuenciaron 16 clones, obteniendose en algunos casos secuencias representadas por varios clones. Todos los insertos secuenciados estaban flanqueados por un codón de inicio (ATG) y un codón de terminación (TAA o TAG), con los siguientes resultados:

-Inserto de *Cynodon dactylon*, plásmido pPC19, tenía 396 pb que codificaba para un polipéptido de 131 aminoácidos que fue llamado CdPRO1.

-Los insertos de *Olea europaea*, plásmidos pPO11, pPO13 y pPO111, tenían 405 pb y codificaban para polipéptidos de 134 aminoácidos que fueron llamados OePRO1, OePRO2 y OePRO3, respectivamente. Las tres secuencias tenían una identidad del 97%.

-Los insertos de *Phleum pratense*, plásmidos pPP19 y pPP112, tenían 396 pb y codificaban para polipéptidos de 131 aminoácidos que fueron llamados PpPRO2 y PpPRO3, respectivamente. Las dos secuencias tenían una identidad del 98%.

-Los insertos de *Parietaria judaica* eran de diferente tamaño. El plásmido pPA18 tenía un inserto de 399 pb, que codificaba para un polipéptido de 132 aminoácidos. El plásmido pPA112 tenía un inserto de 396 pb, que codificaba para un polipéptido de 131 aminoácidos. Los polipéptidos fueron llamados PjPRO1 y PjPRO2, respectivamente. Las dos secuencias tenían una identidad del 96%.

-Inserto de *Mercurialis annua*, tenía 399 pb que codificaba para un polipéptido de 132 aminoácidos que fue llamado MaPRO1.

-Se secuenciaron seis insertos procedentes de *Helianthus annuus*. Dos de ellos, pPG221 y pPG216, correspondían al gen completo, tenía un inserto de 402 pb y codificaban para un polipéptido de 133 aminoácidos. Los cuatro plásmidos restantes, pPG12, pPG14, pPG16, y pPG18, eran secuencias parciales del gen, con su extremos 3´ truncados. Los polipéptidos fueron llamados HaPRO1, HaPRO2, HaPRO3, HaPRO4, HaPRO5, y HaPRO6, respectivamente. Las seis secuencias tenían una identidad media del 98%.

Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras profilinas existentes en el banco de datos (EMBL Data Bank y SWISS-Prot) utilizando el paquete informático GCG (Universidad de Wisconsin Genetics Computer Group). Cuando se compararon con otras profilinas vegetales (maíz, cebada, alubia, hierba timotea, abedul, y tabaco) [(10), (14), (15), (16), (17) y (27) Mittermann, I., Swoboda, I.,

Pierson, E., Eller, N., Kraft, D., Valenta, R., and Heberle-Bors, E. (1995). Molecular cloning and characterization of profilin from tobacco (*Nicotiana tabacum*): increased profilin expression during pollen maturation. Plant. Mol. Biol. 27, 137-146] se encontró una gran homología entre ellas, con más del 70% de residuos idénticos. Por el contrario, cuando se comparó un grupo de profilinas vegetales con otras profilinas eucariótas de animales (hombre, toro), levaduras o protistas se encontró una menor homología. Así por ejemplo, la profilina CdPRO1 de *Cynodon dactylon* tenía una identidad del 46% con *Acanthamoeba castellanii* (EMBL Data Bank M38038); del 42% con *Physarum polycephalum* (M38038) y del 32% con la profilina I humana (J03191). Cuando se compararon profilinas de diferentes orígenes se observó que, aunque presentan diferencias notables, debido a que comparten una función similar, existen unas regiones donde se encuentran un gran número de residuos conservados que serían fundamentales para su función fisiólogica.

Subclonación del gen de profilina en el vector de expresión pKN172

Los vectores recombinantes (2 mg) derivados del pBluescript fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *Hin*dIII y *Nde*I. El fragmento de 400 pb, que contenía el gen de profilina, fue separado por electroforesis en gel de agarosa y aislado del gel. Este fragmento fue ligado al vector de expresión pKN172, digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5a. Las colonias que portaban los plásmidos recombinantes fueron seleccionadas mediante una PCR analítica, en la cual se utilizó como molde una cantidad minúscula de la colonia. El ADN plasmídico de los clones positivos se analizó mediante endonucleasas de restricción, seleccionándose un clon que

tuviera el fragmento deseado. Este plásmido se utilizó para transformar la cepa utilizada en la expresión *E. coli* BL21 (DE3) [(21)]. Esta cepa tiene en su cromosoma un lisógeno del fago 1 conteniendo el gen de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor la cUV. La selección y crecimiento de esta cepa se realizó rutinariamente en placas de LB conteniendo 200 mg/ml de ampicilina.

Expresión de la profilina en *E. coli*

E. coli BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pPC19, que codificaba para la profilina CdPRO1 de *Cynodon dactylon*, se creció en LB con 200 mg/ml de ampicilina a 37°C con agitación. A las 16 horas, se diluyó el cultivo hasta una densidad óptica de 0.3-0.4. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.6, se añadió 0.6 mM de IPTG. A las 3 horas de inducción, el cultivo se recogió por centrifugación a 4000 xg durante 5 minutos, y el sedimento, después de pesado, se congeló a -20°C. Las células se resuspendieron en 1/10 del volumen original, utilizando 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 y NaCl 100 mM. Alícuotas de las muestras, conteniendo aproximadamente 20 mg de proteína, se analizaron en SDS-PAGE 12.5%. se detectó una banda, por tinción de Coomassie, de unos 14 kDa, que estaba mucho más intensa que en el control de pKN172 sin inserto. La banda, cuantificada por densitometría, constituía un 20-30% de proteína total.

Purificación de la profilina recombinante

Las células, procedentes de la expresión descrita en el apartado anterior se sonicaron en hielo durante 2 minutos, en intervalos de 20 segundos. El extracto obtenido se clarificó por centrifugación a 14000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante, conteniendo la profilina expresada, se distribuyó en alícuotas conteniendo 15 mg de proteína, que se aplicaron a una columna de 1 x 7 cm de Sepharose-poli(L)-prolina. La columna fue lavada con 7 volúmenes de tampón PBS, 3 volúmenes de 2 M urea en PBS, y

finalmente la proteína retenida fue eluída con 6 M urea en PBS. Las fracciones que contenían proteína fueron mezcladas y dializadas durante 16 horas frente a agua destilada. La muestra dializada fue liofilizada, y resuspendida en 10 mM Tris-HCl, pH 7.5. Un ejemplo del proceso de purificación de la profilina CdPRO1 de *Cynodon dactylon* se presenta en la figura 1, y de la profilina OePRO1 de *Olea europaea* en la figura 2. Se puede apreciar como el 95% de la proteína expresada se encuentra en forma soluble. La migración de las profilinas recombinantes era similar a la de la profilina natural utilizada como control. Las preparaciones así obtenidas contenían >99% de profilina, como se determinó mediante SDS-PAGE seguida de tinción con plata (Fig. 3).

Purificación de la profilina recombinante (Método alternativo I)

En los casos en los cuales la profilina expresada en *E. coli* no era soluble, y quedaba en el sedimento después de la lisis bacteriana, se diseño un procedimiento alternativo. Las células eran resuspendidas en tampón STE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) suplementado con 100 mg/ml de lisozima, e incubadas durante 15 min en hielo. Posteriormente se añadieron 5 mM ditiotreitol (DTT) y 1.5% N-lauril sarcosina (sarcosil), y se agitó 5 s. Las lisis se completaba con una sonicación de 20 s. El lisado se clarificaba por centrifugación, y al sobrenadante se le añadía 2% de Tritón X-100, y se agitaba otros 5 s. El lisado conteniendo la profilina era aplicado a la columna de poli-L-prolina como se indicará más adelante.

Purificación de la profilina recombinante (Método alternativo II)

Otro método utilizado para la solubilización de la profilina recombinante insoluble es el siguiente: La lisis se realiza en idénticas condiciones que en el ejemplo IX

(incubación en tampón STE con lisozima y sonicación de 20 s), pero se clarificaba por centrifugación. El sedimento, conteniendo la profilina insoluble, era solubilizado con 8 M urea en 100 mM glicina-NaOH pH 9.0 y pasado a través de una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech) equilibrada en 100 mM glicina-NaOH pH 9.0. A la proteína eluida se añadió 5 mM DTT y se dejo incubar a 4°C durante 16 h. La muestra se sometió a cromatografía de afinidad en Sepharosa-poli-L-prolina como se indicará más adelante.

Detección de la profilina recombinante con antisueros de conejo frente a profilina de *Helianthus annuus*

Se corrieron en SDS-PAGE 12.5%, diferentes muestras procedentes de los distintos pasos de la expresión y purificación de profilina, y se transfirieron a membrans de PVDF o nitrocelulosa. Las tiras de membrana, conteniendo las proteínas transferidas, se incubaron con diluciones 1:3000 de suero de conejos inmunizados con profilina purificada de polen de girasol. Después de los lavados, se incubaron con diluciones 1:2000 del anticuerpo conjugado a la enzima peroxidasa. Como se muestra en las figuras 4 y 5, se detectó una banda de reacción mayoritaria a 14 kDa, y otra bandas de menor intensidad en torno a 30 kDa, que podría ser debida a la formación de dímeros de profilina, como describe Babich et al. [(28) Babich, M., Foti, L.R.P., Sykaluk, L.L., and Clark, C.R. (1996). Profilin forms tetramers that bind to G-actin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 218, 125-131]. Otras bandas de menor intensidad, que se aprecian sólo en los extractos de *E. coli*, podrían deberse a reacciones inexpecíficas ya que también se observan en el control sin inserto. Las figuras 4 y 5, muestran la gran efectividad de la columna de Sepharosa-poli-L-prolina, ya que solo un 5% de la profilina aparece en la fracción no retenida, tanto en la purificación CdPRO1

de *Cynodon dactylon* que se muestra en la figura 4, como la de OePRO1 de *Olea europaea* que se muestra en la figura 5.

Detección de la profilina recombinante con anticuerpos IgE procedentes de pacientes atópicos

Se separaron por SDS-PAGE las proteínas del extracto alergénico de *Cynodon dactylon* y la profilina CdPRO1 recombinante, y después de ser transferidas a membranas se incubaron con sueros de pacientes alérgicos a *Cynodon dactylon*. Las profilinas recombinantes mostraron una reactividad similar a las proteínas del extracto natural por las IgE del suero de los pacientes, como se puede observar en la figura 6. Igualmente en pacientes alérgicos a gramíneas, dónde la proporción de *Cynodon dactylon* es menor (siendo predominantes las plantas *Poa pratensis*, *Phleum pratense*, *Lolium perenne*..), también se aprecia reactividad cruzada.

Identidad de epítopos entre la profilina natural y recombinante CdPRO1 de *Cynodon dactylon*

Para estudiar si CdPRO1 de *Cynodon dactylon* era idéntica a la profilina natural, se realizaron experimentos de inhibición. Una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *Cynodon dactylon* se incubó con 10 mg de CdPRO1 por ml de suero, o BSA como control. La adsorción se realizó durante toda la noche a 4°C con agitación moderada. Estos sueros se utilizaron para detectar reactividad con extractos proteicos de *Cynodon dactylon*, profilinas purificadas naturales o recombinantes transferidos a PVDF. La figura 7 muestra que las IgE antiprofilina presentes en los sueros de los pacientes eran adsorbidas por la profilina recombinante, ya que no eran capaces de detectar ninguna banda de 14 kDa correspondiente a la profilina. La banda que aparece a 32 kDa en la muestra de profilina natural, pudiera ser el alérgeno mayor de *Cynodon dactylon* [(29) Matthiesen, F., Schumacher, M.J., and Lowenstein, H.

(1991). Characterization of the major allergen of *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) pollen, *Cyn d* I. J. Allergy Clin. Immunol. 88, 763-774], que en pequeñisimas cantidades copurificaría con la profilina después de un sólo paso por Sepharosa-PLP.

Simulación de la estructura tridimensional de la profilina y predicción de péptidos antigénicos

Las profilinas de plantas y del eucariota inferior *Acanthamoeba* son lo suficiente homólogas, alrededor del 40%, como para poder realizar un modelo por homología de una profilina de plantas, se ha elegido como base la de *Phleum pratense* PpPRO3.

La estructura seleccionada fue la profilina II de *Acanthamoeba castellanii*, y se realizo según el programa WhatIf, visualizandose mediante el programa INSIGHT II, version 2.3.5 (Molecular Modeling System). Este modelo tridimensional deducido se presenta en la figura 8. La predicción de las estructuras con posibilidad inmunogénica se realizó teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- Accesibilidad.
- Factor de temperatura (en estrucutras cristalográficas).
- Predicción de la estructura secundaria, teniendo en cuenta que las estructuras en bucle, son las más favorecidas.
- Características de loa aminoácidos de la zona.
- Regiones que presenten secuencias diferentes entre mamíferos y plantas.

Este último requisito permite que los péptidos elegidos no sean inmunogénicos en mamíferos, concretamente el hombre. Los péptidos seleccionados según estos criterios aparecen en la figura 9, con todos los péptidos correspondientes a las profilinas secuenciadas.

Purificación y caracterización de la profilina natural de *Helianthus annuus*

Purificación cromatográfica de la profilina de *Helianthus annuus*

El aislamiento de profilinas de polen de girasol mediante cromatografía de afinidad en columna de Sepharosa-PLP resultó altamente efectivo, según se pudo evaluar mediante SDS-PAGE (Fig. 10), ya que tan sólo se obervaron unas ténues bandas de contaminantes. El peso molecular de la banda de proteína determinada por análisis de imagen en el sistema BIO-IMAGE fue de 15.7 kDa.

La fracción 6 M eluída de la columna de Sepharose-PLP que contenía profilina fue purificada posteriormente, con el fin de eliminar los contaminantes menores y para poder llevar a cabo posteriormente la secuenciación de aminoácidos y los ensayos de inmunización. Se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico en el sistema micropreparativo de alta resolución SMARTTM (Pharmacia LKB, Sweden). Se empleó una columna de intercambio aniónico (MonoQ PC 1.6/5). Se aplicaron 40 mg de fracción de profilina mediante inyección de 1 ml de muestra disuelta en Tris-HCl 40 mM, pH 8.0. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente lineal generado por la adición de NaCl 1M al tampón inicial. Gracias a esta técnica obtuvimos una muestra de profilina pura, que eluyó como un pico simétrico a una concentración de 0.25 M NaCl.

Para la estimación del peso molecular se empleó también en el sistema SMART con una columna de tamizado molecular Superdex 75 PC 3.2/30. La muestras se aplicaron a una concentración de 20 mg/ml en tampón fosfato 0.05 M, NaCl 0.15 M pH 7.0 (PBS) mediante inyección de 20 ml. Se mantuvo un flujo de 40 ml/min durante todo el proceso cromatográfico y a 8°C. En el calibrado de la columna se emplearon grupos de proteínas de peso molecular conocido.

Utilizando esta técnica se estimó el peso molecular nativo que fue de 19.1 kDa. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la figura 11.

Las muestras de profilina pura fueron también caracterizadas por isoeléctroenfoque en geles de agarosa (Agarose-IEF). Aquí, se detectó la presencia de tres isoformas (Fig. 12) con pIs 4.41, 4.46 y 4.50 respectivamente.

Composición de aminoácidos de la profilina de *Helianthus annuus*

Se determinó la composición en aminoácidos de la profilina purificada por el sistema SMART. Para ello se disolvieron 20 ml de la muestra de profilina purificada en 200 ml de agua destilada; de esta disolución, se emplearon 4 ml para el análisis de aminoácidos en un Beckman Analyser modelo 6300 intercambiador iónico, tras hidrólisis a 115°C durante 16 h., en 100 ml de HCl 6 N, fenol 0.2% conteniendo también norleucina 2 nmol. Después de la hidrólisis, el ácido fue eliminado en Speedvac y los aminoácidos resultantes se disolvieron en 100 ml de tampón de muestra Beckman conteniendo 2 nmol de homoserina. El instrumento se utilizó siguiendo los programas del fabricante con el uso de sus tampones. El análisis de los datos se efectuó en un ordenador externo utilizando el software de adquisición de datos Perkin Elmer/Nelson.

Secuenciación proteica de la profilina de *Helianthus annuus*

Tras observar que el extremo N-terminal de la profilina estaba bloqueada, se decidió llevar a cabo la secuenciación de péptidos internos, para ello se digirió enzimáticamente la muestra con tripsina modificada (Promega), o bien, lisil endopeptidasa (Wako) durante 24 h a 37°C. Los péptidos resultantes fueron reducidos/carboximutilados, extraídos con TFA 0.1%, CH_3CN y después sometidos a HPLC de fase reversa utilizando un equipo Hewlett Packard 1090 equipado con un colector de fracciones Isco modelo

2150 y una columna de 25 cm Vydac C-18, equilibrada con un 98% de tampón A (TFA al 0,06%) y un 2% de tampón B (TFA al 0.052%, acetonitrilo 80%. Los péptidos fueron eluídos con el siguiente programa de gradiente:0-60 min (2-37% B), 60-90 min (37-75% B) y 90-105 min (75-98% B) y fueron detectados por su absorbancia a 210 nm. Las cantidades digeridas, generalmente en el rango de 25-250 pmol fueron fraccionadas en columnas ID de 2.1 mm, eluídas a 0.15 ml/min, mientras que las cantidades mayores lo fueron en columnas de 4.6 mm eluídas a 0.15 ml/min. Después de la carga, los tubos de muestra se aclararon con 50 ml de ácido trifluoroacético el cual fue entonces sobre añadido en capa sobre el filtro de secuenciación.

El peso molecular de los péptidos se estudió por espectrometría de masas de desorpción por láser utilizando un espectrómetro de masas VG/Fisons TofSpec equipado con un láser de nitrógeno (337 nm) y un tubo de dirección linear de 0.65 m.

La secuenciación de los péptidos resultantes se realizó con secuenciadores Applied Biosystems modelos 470A ó 477. Las secuencias resultantes aparecen en la figura 13 comparandolas con las secuencias obtenidas por la secuenciación de ADNc. Las secuencias peptídicas parciales coinciden en algunos casos con alguna de las secuencias deducidas de los genes clonados. En otros casos, las secuencias no coinciden con las obtenidas por clonación lo que indicaría que la existencia de otras isoformas o variantes no clonadas.

Reactividad cruzada de la profilina de *Helianthus annuus*

La naturaleza alergénica de la profilina purificada fue confirmada mediante SDS-PAGE Immunoblotting. Para ello, se transfirieron a membranas PVDF tres calles de profilina sometida a electroforesis y se revelaron con una mezcla de sueros humanos positivos a girasol, hierbas y frutos de

Rosaceas (manzana, pera y melocotón). En los dos últimos casos (hierbas y frutos), la participación de la profilina como alérgeno, ha sido apuntada y definida como causante de la reactividad cruzada. La fijación de IgE a partir de los 3 sueros de grupo en la banda de profilina se puede observar en la figura 14.

La muestra de profilina pura (tras realizar la cromatografía SMART) se empleó para obtener un antisuero policlonal, con el fin de investigar las posibles reacciones cruzadas antigénicas con diferentes extractos alergénicos, mediante SDS-PAGE Immunoblotting. Primeramente, algunos extractos en cuya composición se conocía la existencia de las profilinas se incubaron con suero anti-profilina de girasol (Fig. 15). Como se puede observar, los cuatro extractos analizados mostraron unión de IgG en la banda doblete localizada entre 14.4 y 20.1 kDa correspondiente a la profilina.

Finalmente, se evaluó la posible naturaleza profilínica de las proteínas de diferentes extractos alergénicos comunes. Los resultados se muestran en la figura 16. Se encontraron proteínas fijadoras de IgG (lo que es indicativo de su naturaleza profilínica o de un alto grado de homología) en extractos de polen (*Phleum*, *Olea*, *Parietaria* y *Mercurialis*), así como en estambres de la flor del azafrán y del hongo *Aspergillus fumigatus*. Por otro lado, no se observó ninguna fijación en principio en extractos de epitelio de perro, ácaros u hongos.

USOS Y ADMINISTRACION

La presente invención cubre el uso de la profilina de las plantas descritas o péptidos sintéticos derivados de ella para tratamientos de insensibilización en mamíferos. El método de desensibilización implica la administración repetida por vias parenteral (subcutánea, intravenosa o intramuscular), oral, nasal o rectal del alérgeno en

cuestión. Tanto la proteína como sus péptidos pueden administrarse tanto sólos como en combinación con otros diluyentes, de acuerdo con la legislación vigente y los procedimientos galénicos al uso. Un rango desde 1 picogramo a 10 miligramos por aplicación puede ser usado.

La presente invención también cubre la utilización de profilinas recombinantes para cualquier uso diagnóstico "in vivo", tales como: Prick test, intradermo-reacción o pruebas de Provocación, utilizando un rango desde 1 picogramo a 10 miligramos por aplicación. También cubre la utilización de profilinas recombinantes para diagnóstico "in vitro" mediante técnicas de: inmunoensayo, liberación de histamina y test de transformación linfoblástica.

LISTA DE SECUENCIAS

1. INFORMACIÓN GENERAL:

SOLICITANTE:

NOMBRE: Industrial Farmaceútica y de Especialidades, S.A.

CALLE: Alameda de Urquijo 27

CIUDAD: Bilbao

PROVINCIA: Vizcaya

PAIS: España

CÓDIGO POSTAL: 48008

TÍTULO DE LA INVENCIÓN: **ADN RECOMBINANTE QUE CODIFICA PARA EPÍTOPOS DEL ALERGENO PROFILINA ÚTIL PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE ALERGIAS**

NÚMERO DE SECUENCIAS: 30

FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

TIPO DE SOPORTE: disco de 3 ½"

ORDENADOR: compatible

SISTEMA OPERATIVO: Windows 95

SOFTWARE: Microsoft Word para Windows 95

INFORMACIÓN SOBRE EL REPRESENTANTE/AGENTE:

NOMBRE: Javier Ungría López

NÚMERO DE REGISTRO: 392/1

INFORMACIÓN SOBRE TELECOMUNICACIÓN:

TELÉFONO: 914136062

FAX: 914136417

2. Información de SEQ ID NO: 1 :

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 396

(b) Tipo: ácido nucléico

(c) Topología: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm

(iii) Origen:

(a) Organismo: Cynodon dactylon

(b) Tejido: polen

(iv) Características: 1-396 región codificante de CdPRO1

(v) Descripción: SEQ ID NO: 1:

ATGTCGTGGC AGGCGTACGT GGACGACCAC CTCATGTGCG AGATCGAGGG 50
ACATCACCTC ACCTCCGCCG CCATCATCGG CCATGACGGC ACCGTCTGGG 100
CTCAGAGCGC CGCCTTCCCG GCGTTCAAGC CTGAGGAGAT GCCAACATCG 150
ATGAAGGACT TCGACGAGCC CGGGTTTCTT GCACCCACCG GCCTCTTCCT 200
CGGCCCCACC AAGTACATGG TCATCCAGGG CGAGCCCGGC GCCGTCATCC 250
GCGGAAAGAA GGGATCAGGT GGTGTCACTG TGAAGAAGAC TGGTCAGGCT 300
CTTGTGATCG GCATCTACGA CGAGCCAATG ACCCCCGGAC AGTGCAACAT 350
GGTGATCGAG AAGCTCGGCG ATTACCTCAT TGAACAAGGC ATGTAA 396

3. Información de SEQ ID NO: 2 :

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 131

(b) Tipo: aminoácido

(c) Topología: lineal

(ii) Tipo de molécula: péptido

(iii) Origen:

(a) Organismo: Cynodon dactylon

(b) Tejido: polen

(iv) Características: péptido CdPRO1

(v) Descripción: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Trp Gln Ala Tyr Val Asp Asp His Leu Met Cys Glu Ile
5 10 15

Glu Gly His His Leu Thr Ser Ala Ala Ile Ile Gly His Asp Gly
20 25 30

Thr Val Trp Ala Gln Ser Ala Ala Phe Pro Ala Phe Lys Pro Glu
35 40 45

Glu Met Ala Asn Ile Met Lys Asp Phe Asp Glu Pro Gly Phe Leu
50 55 60

Ala Pro Thr Gly Leu Phe Leu Gly Pro Thr Lys Tyr Met Val Ile
65 70 75

Gln Gly Glu Pro Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ser Gly
80 85 90

Gly Val Thr Val Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Ile Gly Ile
95 100 105

Tyr Asp Glu Pro Met Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Ile Glu
110 115 120

Lys Leu Gly Asp Tyr Leu Ile Glu Gln Gly Met
125 130

4. Información de SEQ ID NO: 3 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 396
(b) Tipo: ácido nucléico
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm
(iii) Origen:
(a) Organismo: Phleum pratense
(b) Tejido: polen
(iv) Características: 1-396 región codificante de PpPRO3
(v) Descripción: SEQ ID NO: 3:

ATGTCGTGGC AGACGTACGT GGACGAGCAC CTGATGTGCG AGATCGAGGG 50
CCACCACCTC GCCTCCGCGG CCATCCTCGG CCACGACGGC ACCGTCTGGG 100
CCCAGAGCGC CGACTTCCCC CAGTTCAAGC CTGAGGAGAT CACCGGCATC 150
ATGAAGGATT TCGACGAGCC GGGGCACCTC GCCCCCACCG GCATGTTCGT 200
CGCAGGTGCC AAGTACATGG TCATCCAGGG TGAACCCGGC GCGGTCATCC 250
GTGGCAAGAA GGGAGCAGGA GGCATCACCA TAAAGAAGAC CGGGCAGGCG 300
CTGGTCGTCG GCATCTACGA CGAGCCCATG ACCCCTGGGC AGTGCAACAT 350
GGTGGTGGAG AGGCTTGGCG ACTACCTCGT TGAACAAGGC ATGTAG 396

5. Información de SEQ ID NO: 4 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 131

(b) Tipo: aminoácido
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: péptido
(iii) Origen:
(a) Organismo: Phleum pratense
(b) Tejido: polen
(iv) Características: péptido PpPRO3
(v) Descripción: SEQ ID NO: 4:

```
Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Glu Ile
 1               5                  10                  15

Glu Gly His His Leu Ala Ser Ala Ala Ile Leu Gly His Asp Gly
            20                  25                  30

Thr Val Trp Ala Gln Ser Ala Asp Phe Pro Gln Phe Lys Pro Glu
        35                  40                  45

Glu Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Asp Glu Pro Gly His Leu
    50                  55                  60

Ala Pro Thr Gly Met Phe Val Ala Gly Ala Lys Tyr Met Val Ile
65                  70                  75

Gln Gly Glu Pro Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ala Gly
            80                  85                  90

Gly Ile Thr Ile Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Val Gly Ile
        95                  100                 105

Tyr Asp Glu Pro Met Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu
    110                 115                 120

Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Val Glu Gln Gly Met
125                 130
```

6. Información de SEQ ID NO: 5 :

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 396

(b) Tipo: ácido nucléico

(c) Topología: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm

(iii) Origen:

(a) Organismo: Phleum pratense

(b) Tejido: polen

(iv) Características: 1-396 región codificante de PpPRO2

(v) Descripción: SEQ ID NO: 5:

ATGTCGTGGC AGACGTACGT GGACGAGCAC CTGATGTGCG AGATCGAGGG 50

CCACCACCTC GCCTCCGCGG CCATCCTCGG CCACGACGGC ACCGTCTGGG 100

CCCAGAGCGC CGACTTCCCC CAGTTCAAGC CTGAGGAGAT CACCGGCATC 150

ATGAAGGATT TCGACGAGCC GGGGCACCTC GCCCCCACCG GCATGTTCGT 200

CGCAGGTGCC AAGTACATGG TCATCCAGGG TGAACCCGGC GCGGTCATCC 250

GTGGCAAGAA GGGAGCAGGA GGCATCACCA TAAAGAAGAC CGGGCAGGCG 300

CTGGTCGTCG GCATCTATGA CGAGCCCATG ACCCCTGGGC AGTGCAACAT 350

GGTGGTGGAG AGGCTTGGCG ACTACCTCGT TGAACAAGGC ATGTAG 396

7. Información de SEQ ID NO: 6 :

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 131

(b) Tipo: aminoácido

(c) Topología: lineal

(ii) Tipo de molécula: péptido

(iii) Origen:

(a) Organismo: Phleum pratense

(b) Tejido: polen

(iv) Características: péptido PpPRO2

(v) Descripción: SEQ ID NO: 6:

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Glu Ile

5 10 15

Glu Gly His His Leu Ala Ser Ala Ala Ile Leu Gly His Asp Gly
20 25 30

Thr Val Trp Ala Gln Ser Ala Asp Phe Pro Gln Phe Lys Pro Glu
35 40 45

Glu Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Asp Glu Pro Gly His Leu
50 55 60

Ala Pro Thr Gly Met Phe Val Ala Gly Ala Lys Tyr Met Val Ile
65 70 75

Gln Gly Glu Pro Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ala Gly
80 85 90

Gly Ile Thr Ile Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Val Gly Ile
95 100 105

Tyr Asp Glu Pro Met Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu
110 115 120

Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Val Glu Gln Gly Met
125 130

8. Información de SEQ ID NO: 7 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 396
(b) Tipo: ácido nucléico
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm
(iii) Origen:
(a) Organismo: Parietaria judaica
(b) Tejido: polen
(iv) Características: 1-396 región codificante de PjPRO2
(v) Descripción: SEQ ID NO: 7:

ATGTCGTGGC AGGCGTACGT CGATGACCAC CTTATGTGCG ACGTCGGCGA 50
CGGCAATACA CTCGCTTCCG CCGCCATCAT CGGCCACGAT GGCAGCGTTT 100
GGGCTCAGAG CGCTAACTTC CCTCAGTTGA AGCCAGAAGA GGTTACTGGA 150
ATCATGAATG ATTTTAATGA GGGTGGATTT CTTGCCCCAA CCGGGTTGTT 200
CCTTGGAGGT ACAAAGTATA TGGTGATCCA AGGGGAGTCT GGAGCCGTGA 250
TCGGGAAGAA GGGTTCTGGA GGTGCCACTT TGAAGAAAAC TGGGCAAGCA 300
ATTGTTATTG GCATTTACGA CGAACCAATG ACCCCAGGAC AATGCAATTT 350
GGTAGTAGAG AGGTTGGGCG ATTACCTCCT AGAACAAGGC ATGTAG 396

9. Información de SEQ ID NO: 8 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 131
(b) Tipo: aminoácido
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: péptido
(iii) Origen:
(a) Organismo: Parietaria judaica
(b) Tejido: polen
(iv) Características: péptido PjPRO2
(v) Descripción: SEQ ID NO: 8:

Met Ser Trp Gln Ala Tyr Val Asp Asp His Leu Met Cys Asp Val
5 10 15

Gly Asp Gly Asn Thr Leu Ala Ser Ala Ala Ile Ile Gly His Asp
20 25 30

Gly Ser Val Trp Ala Gln Ser Ala Asn Phe Pro Gln Leu Lys Pro
35 40 45

Glu Glu Val Thr Gly Ile Met Asn Asp Phe Asn Glu Gly Gly Phe
50 55 60

Leu Ala Pro Thr Gly Leu Phe Leu Gly Gly Thr Lys Tyr Met Val
65 70 75

Ile Gln Gly Glu Ser Gly Ala Val Ile Gly Lys Lys Gly Ser Gly
80 85 90

Gly Ala Thr Leu Lys Lys Thr Gly Gln Ala Ile Val Ile Gly Ile
95 100 105

Tyr Asp Glu Pro Met Thr Pro Gly Gln Cys Asn Leu Val Val Glu
110 115 120

Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Leu Glu Gln Gly Met
125 130

10. Información de SEQ ID NO: 9 :

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 399

(b) Tipo: ácido nucléico

(c) Topología: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm

(iii) Origen:

(a) Organismo: Parietaria judaica

(b) Tejido: polen

(iv) Características: 1-399 región codificante de PjPRO1

(v) Descripción: SEQ ID NO: 9:

ATGTCGTGGC AGGCGTACGT TGATGACCAC CTTATGTGCG ACGTCGGCGA 50
CGGCAATACA CCCGCTTCCG CCGCTATCAT CGGCCATGAT GGCAGCGTTT 100
GGGCTCAGAG CGCTAACTTC CCTCAGTTGA AGCCAGAAGA GGTTACTGGA 150
ATCATGAATG ATTTTAATGA AGCTGGATTT CTTGCCCCAA CCGGGTTGTT 200
CCTTGGAGGT ACAAAGTATA TGGTGATCCA AGGGGAGTCT GGAGCCGTGA 250
TTCGTGGGAA GAAGGGTTCT GGAGGTGCCA CTTTGAAGAA AACTGGGCAA 300
GCAATTGTTA TTGGCATTTA CGACGAGCCA ATGACCCCAG GACAATGCAA 350
TTTGGTAGTA GAGAGGTTGG GCGATTACCT TCTCGAACAG GGCCTGTAG 399

11. Información de SEQ ID NO: 10 :

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 132

(b) Tipo: aminoácido

(c) Topología: lineal

(ii) Tipo de molécula: péptido
(iii) Origen:
(a) Organismo: Parietaria judaica
(b) Tejido: polen
(iv) Características: péptido PjPRO1
(v) Descripción: SEQ ID NO: 10:

Met Ser Trp Gln Ala Tyr Val Asp Asp His Leu Met Cys Asp Val
5 10 15

Gly Asp Gly Asn Thr Pro Ala Ser Ala Ala Ile Ile Gly His Asp
20 25 30

Gly Ser Val Trp Ala Gln Ser Ala Asn Phe Pro Gln Leu Lys Pro
35 40 45

Glu Glu Val Thr Gly Ile Met Asn Asp Phe Asn Glu Ala Gly Phe
50 55 60

Leu Ala Pro Thr Gly Leu Phe Leu Gly Gly Thr Lys Tyr Met Val
65 70 75

Ile Gln Gly Glu Ser Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ser
80 85 90

Gly Gly Ala Thr Leu Lys Lys Thr Gly Gln Ala Ile Val Ile Gly
95 100 105

Ile Tyr Asp Glu Pro Met Thr Pro Gly Gln Cys Asn Leu Val Val
110 115 120

Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Leu Glu Gln Gly Leu
125 130

12. Información de SEQ ID NO: 11 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 405

(b) Tipo: ácido nucléico
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm
(iii) Origen:
(a) Organismo: Olea europaea
(b) Tejido: polen
(iv) Características: 1-405 región codificante de OePRO1
(v) Descripción: SEQ ID NO: 11:

ATGTCGTGGC AGGCGTACGT TGATGATCAT TTGATGTGTG ACATTGAGGG 50
CCATGAAGAC CACCGCCTCA CCGCAGCTGC CATCGTCGGC CATGACGGTT 100
CTGTTTGGGC TCAGAGCGCT ACCTTCCCTC AGTTCAAGCC AGAGGAGATG 150
AATGGAATTA TGACAGATTT CAATGAACCT GGTCATCTGG CACCAACAGG 200
CCTACATCTT GGAGGAACAA AGTATATGGT GATTCAAGGA GAGGCTGGAG 250
CTGTCATCCG TGGAAAGAAG GGATCTGGTG GTATTACCAT TAAGAAGACT 300
GGCCAAGCAC TAGTTTTTGG TATCTACGAG GAGCCTGTAA CTCCAGGACA 350
ATGCAACATG GTTGTCGAGA GGTTGGGAGA CTACCTGGTC GAACAAGGCA 400
TGTAA 405

13. Información de SEQ ID NO: 12 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 134
(b) Tipo: aminoácido
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: péptido
(iii) Origen:
(a) Organismo: Olea europaea
(b) Tejido: polen
(iv) Características: péptido OePRO1
(v) Descripción: SEQ ID NO: 12:

Met Ser Trp Gln Ala Tyr Val Asp Asp His Leu Met Cys Asp Ile
5 10 15

Glu Gly His Glu Asp His Arg Leu Thr Ala Ala Ala Ile Val Gly
20 25 30

His Asp Gly Ser Val Trp Ala Gln Ser Ala Thr Phe Pro Gln Phe
35 40 45

Lys Pro Glu Glu Met Asn Gly Ile Met Thr Asp Phe Asn Glu Pro
50 55 60

Gly His Leu Ala Pro Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Thr Lys Tyr
65 70 75

Met Val Ile Gln Gly Glu Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys
80 85 90

Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val
95 100 105

Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met
110 115 120

Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Val Glu Gln Gly Met
125 130

14. Información de SEQ ID NO: 13 :

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 405

(b) Tipo: ácido nucléico

(c) Topología: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm

(iii) Origen:

(a) Organismo: Olea europaea

(b) Tejido: polen

(iv) Características: 1-405 región codificante de OePRO2

(v) Descripción: SEQ ID NO: 13:

ATGTCGTGGC AGGCGTACGT TGATGATCAT TTGATGTGTG ACATTGAGGG 50

CCATGAAGGC CACCGCCTCA CCGCAGCTGC CATCGTCGGC CATGACGGTT 100

CTGTTTGGGC TCAGAGCGCT ACCTTCCCTC AGTTCAAGCC AGAGGAGATG 150

AATGGAATTA TGACAGATTT CAATGAACCT GGTCATCTGG CACCAACAGG 200

CCTACATCTT GGAGGAACAA AGTATATGGT GATTCAAGGA GAGGCTGGAG 250
CCGTCATCCG TGGAAAGAAG GGATCTGGTG GTATTACCAT TAAGAAGACT 300
GGCCAAGCAC TAGTTTTTGG TATCTACGAG GAGCCTGTAA CTCCAGGACA 350
ATGCAACATG GTTGTCGAGA GGTTGGGAGA CTACCTGCTT GAACAAGGCC 400
TGTAA 405

15. Información de SEQ ID NO: 14 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 134
(b) Tipo: aminoácido
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: péptido
(iii) Origen:
(a) Organismo: Olea europaea
(b) Tejido: polen
(iv) Características: péptido OePRO2
(v) Descripción: SEQ ID NO: 14:

Met Ser Trp Gln Ala Tyr Val Asp Asp His Leu Met Cys Asp Ile
5 10 15

Glu Gly His Glu Gly His Arg Leu Thr Ala Ala Ala Ile Val Gly
20 25 30

His Asp Gly Ser Val Trp Ala Gln Ser Ala Thr Phe Pro Gln Phe
35 40 45

Lys Pro Glu Glu Met Asn Gly Ile Met Thr Asp Phe Asn Glu Pro
50 55 60

Gly His Leu Ala Pro Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Thr Lys Tyr
65 70 75

Met Val Ile Gln Gly Glu Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys
80 85 90

Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val
95 100 105

Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met
110 115 120

Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Leu Glu Gln Gly Leu
125 130

16. Información de SEQ ID NO: 15 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 405
(b) Tipo: ácido nucléico
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm
(iii) Origen:
(a) Organismo: Olea europaea
(b) Tejido: polen
(iv) Características: 1-405 región codificante de OePRO3
(v) Descripción: SEQ ID NO: 15:

ATGTCGTGGC AGGCGTACGT TGATGATCAT TTGATGTGTG ACATTGAGGG 50
CCATGAAGGC CACCGCCTCA CCGCAGCTGC CATCGTCGGC CATGACGGTT 100
CTGTTTGGGC TCAGAGCGCT ACCTTCCCTC AGTTCAAGCC AGAGGAGATG 150
AATGGAATTA TGACAGATTT CAATGAACCT GGTCATCTGG CACCAACAGG 200
CCTACATCTT GGAGGAACAA AGTATATGGT GATTCAAGGA GAGGCTGGAG 250
CTGTCATCCG TGGAAAGAAG GGATCTGGTG GTATTACCAT TAAGAAGACT 300
GGCCAAGCAC TAGTTTTTGG TATCTACGAG GAGCCTGTAA CTCCAGGACA 350
ATGCAACATG GTTGCCGAGA GGTTGGGAGA CTACCTGCTA GAACAAGGCC 400
TGTAG 405

17. Información de SEQ ID NO: 16 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 134
(b) Tipo: aminoácido
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: péptido
(iii) Origen:

(a) Organismo: Olea europaea
(b) Tejido: polen
(iv) Características: péptido OePRO3
(v) Descripción: SEQ ID NO: 16:

Met Ser Trp Gln Ala Tyr Val Asp Asp His Leu Met Cys Asp Ile
5 10 15

Glu Gly His Glu Gly His Arg Leu Thr Ala Ala Ala Ile Val Gly
20 25 30

His Asp Gly Ser Val Trp Ala Gln Ser Ala Thr Phe Pro Gln Phe
35 40 45

Lys Pro Glu Glu Met Asn Gly Ile Met Thr Asp Phe Asn Glu Pro
50 55 60

Gly His Leu Ala Pro Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Thr Lys Tyr
65 70 75

Met Val Ile Gln Gly Glu Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys
80 85 90

Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val
95 100 105

Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met
110 115 120

Val Ala Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Leu Glu Gln Gly Leu
125 130

18. Información de SEQ ID NO: 17 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 402
(b) Tipo: ácido nucléico

(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm
(iii) Origen:
(a) Organismo: Helianthus annuus
(b) Tejido: polen
(iv) Características: 1-402 región codificante de HaPRO1
(v) Descripción: SEQ ID NO: 17:

ATGTCGTGGC AGGCGTACGT CGATGAACAC TTGATGTGCG ACATTGAAGG 50
TACTGGCCAG CATCTCACAT CTGCCGCTAT TCTCGGTCTC GACGGTACTG 100
TTTGGGCTCA GAGCGCTAAG TTTCCACAGT TTAAACCTGA GGAGATGAAA 150
GGCATCATTA AGGAATTCGA CGAAGCTGGT ACTCTTGCTC CAACAGGTAT 200
GTTCATCGCG GGTGCAAAAT ATATGGTACT CCAAGGAGAG CCTGGAGCTG 250
TTATCCGTGG AAAGAAGGGA GCTGGAGGAA TATGCATCAA GAAAACGGGC 300
CAAGCTATGA TTATGGGAAT TTACGACGAG CCCGTTGCTC CTGGACAATG 350
CAACATGGTT GTTGAGAGGC TTGGCGATTA CCTCCTCGAA CAAGGCATGT 400
AA 402

19. Información de SEQ ID NO: 18 :
(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 133
(b) Tipo: aminoácido
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: péptido
(iii) Origen:
(a) Organismo:Helianthus annuus
(b) Tejido: polen
(iv) Características: péptido HaPRO1
(v) Descripción: SEQ ID NO: 18:

Met Ser Trp Gln Ala Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile
5 10 15

Glu Gly Thr Gly Gln His Leu Thr Ser Ala Ala Ile Leu Gly Leu
20 25 30

Asp Gly Thr Val Trp Ala Gln Ser Ala Lys Phe Pro Gln Phe Lys
35 40 45

Pro Glu Glu Met Lys Gly Ile Ile Lys Glu Phe Asp Glu Ala Gly
50 55 60

Thr Leu Ala Pro Thr Gly Met Phe Ile Ala Gly Ala Lys Tyr Met
65 70 75

Val Leu Gln Gly Glu Pro Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly
80 85 90

Ala Gly Gly Ile Cys Ile Lys Lys Thr Gly Gln Ala Met Ile Met
95 100 105

Gly Ile Tyr Asp Glu Pro Val Ala Pro Gly Gln Cys Asn Met Val
110 115 120

Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Leu Glu Gln Gly Met
125 130

20. Información de SEQ ID NO: 19 :

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 402

(b) Tipo: ácido nucléico

(c) Topología: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm

(iii) Origen:

(a) Organismo: Helianthus annuus

(b) Tejido: polen

(iv) Características: 1-402 región codificante de HaPRO2

(v) Descripción: SEQ ID NO: 19:

ATGTCGTGGC AGGCGTACGT CGATGAACAC TTGATGTGCG ACATTGAAGG 50

TACTGGCCAG CATCTCACAT CTGCCGCTAT TCTCGGTCTC GACGGTACTG 100

TTTGGGCTCA GAGCGCTAAG TTTCCACAGT TCAAACCCGA GGAGATGAAA 150

GGCATCATTA AGGAATTCGA CGAAGCTGGT ACTCTTGCTC CAACAGGTAT 200

GTTCATCGCG GGTGCAAAAT ATATGGTACT CCAAGGAGAG CCCGGAGCTG 250
TTATCCGTGG AAAGAAGGGA GCTGGAGGAA TATGCATCAA GAAAACGGGC 300
CAAGCTATGA TTATGGGAAT TTACGACGAG CCCGTTGCTC CTGGACAATG 350
CAACATGGTT GTTGAGAGGC TTGGCGATTA CCTGCTCGAA CAAGGCATGT 400
AA 402

21. Información de SEQ ID NO: 20 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 133
(b) Tipo: aminoácido
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: péptido
(iii) Origen:
(a) Organismo:Helianthus annuus
(b) Tejido: polen
(iv) Características: péptido HaPRO2
(v) Descripción: SEQ ID NO: 20:

Met Ser Trp Gln Ala Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile
5 10 15

Glu Gly Thr Gly Gln His Leu Thr Ser Ala Ala Ile Leu Gly Leu
20 25 30

Asp Gly Thr Val Trp Ala Gln Ser Ala Lys Phe Pro Gln Phe Lys
35 40 45

Pro Glu Glu Met Lys Gly Ile Ile Lys Glu Phe Asp Glu Ala Gly
50 55 60

Thr Leu Ala Pro Thr Gly Met Phe Ile Ala Gly Ala Lys Tyr Met
65 70 75

Val Leu Gln Gly Glu Pro Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly
80 85 90

Ala Gly Gly Ile Cys Ile Lys Lys Thr Gly Gln Ala Met Ile Met
95 100 105

Gly Ile Tyr Asp Glu Pro Val Ala Pro Gly Gln Cys Asn Met Val
110 115 120

Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Leu Glu Gln Gly Met
125 130

22. Información de SEQ ID NO: 21 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 390
(b) Tipo: ácido nucléico
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm
(iii) Origen:
(a) Organismo: Helianthus annuus
(b) Tejido: polen
(iv) Características: 1-390 parte de la región codificante de HaPRO3
(v) Descripción: SEQ ID NO: 21:

ATGTCGTGGC AGACGTACGT CGATGAACAC TTGATGTGCG ACATTGAAGG 50
TACTGGCCAG CATCTCACAT CTGCCGCTAT TCTCGGTCTC GACGGTACTG 100
TTTGGGCTCA GAGCGCTAAG TTTCCACAGT TTAAACCTGA GGAGATGAAA 150
GGCATCATTA AGGGATTCGA CGAAGCTGGT ACTCTTGCTC CAACAGGTAT 200
GTTTATCGCG GGTGCAAAAT ATATGGTACT CCAAGGAGAG CCTGGAGCTG 250
TTATCCGTGG AAAGAAGGGA GCTGGAGGAA TATGCATCAA GAAAACGGGC 300
CAAGCTATGA TTATGGGAAT TTACGACGAG CCCGTTGCTC CTGGACAATG 350
CAACATGGTT GTTGAGAGGC TCGGTGACTA CCTCTAATGA 390

23. Información de SEQ ID NO: 22 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 128
(b) Tipo: aminoácido
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: péptido
(iii) Origen:

(a) Organismo:Helianthus annuus

(b) Tejido: polen

(iv) Características: secuencia parcial del péptido Ha-PRO3

(v) Descripción: SEQ ID NO: 22:

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile
5 10 15

Glu Gly Thr Gly Gln His Leu Thr Ser Ala Ala Ile Leu Gly Leu
20 25 30

Asp Gly Thr Val Trp Ala Gln Ser Ala Lys Phe Pro Gln Phe Lys
35 40 45

Pro Glu Glu Met Lys Gly Ile Ile Lys Gly Phe Asp Glu Ala Gly
50 55 60

Thr Leu Ala Pro Thr Gly Met Phe Ile Ala Gly Ala Lys Tyr Met
65 70 75

Val Leu Gln Gly Glu Pro Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly
80 85 90

Ala Gly Gly Ile Cys Ile Lys Lys Thr Gly Gln Ala Met Ile Met
95 100 105

Gly Ile Tyr Asp Glu Pro Val Ala Pro Gly Gln Cys Asn Met Val
110 115 120

Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu
125

24. Información de SEQ ID NO: 23 :

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 390

(b) Tipo: ácido nucléico

(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm
(iii) Origen:
(a) Organismo: Helianthus annuus
(b) Tejido: polen
(iv) Características: 1-390 parte de la región codificante de HaPRO4
(v) Descripción: SEQ ID NO: 23:

ATGTCGTGGC AGACGTACGT CGATGAACAC TTGATGTGCG ACATTGAAGG 50
TACTGGCCAC CATCTCACAT CTGCCGCTAT TCTCGGTCTC GACGGTACTG 100
TTTGGGCTCA GAGCGCTAAG TTTCCACAGT TTAAACCTGA GGAGATGAAA 150
GGCATCATTA AGGAATTCGA CGAAGCTGGT ACTCTTGCTC CAACAGGTAT 200
GTTCATCGCG GGTGCAAAAT ATATGGTACT CCAAGGAGAG CCTGGAGCTG 250
TTATCCGTGG AAAGAAGGGA GCTGGAGGAA TATGCATCAA GAAAACGGGC 300
CAAGCTATGA TTATGGGAAT TTACGACGAG CCCGTTGCTC CTGGACAATG 350
CAACATGGTT GTTGAGAGGC TCGGTGACTA CCTCTAATGA 390

25. Información de SEQ ID NO: 24 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 128
(b) Tipo: aminoácido
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: péptido
(iii) Origen:
(a) Organismo:Helianthus annuus
(b) Tejido: polen
(iv) Características: secuencia parcial del péptido HaPRO4
(v) Descripción: SEQ ID NO: 24:

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile
5 10 15

Glu Gly Thr Gly His His Leu Thr Ser Ala Ala Ile Leu Gly Leu
20 25 30

Asp Gly Thr Val Trp Ala Gln Ser Ala Lys Phe Pro Gln Phe Lys
35 40 45

Pro Glu Glu Met Lys Gly Ile Ile Lys Glu Phe Asp Glu Ala Gly
50 55 60

Thr Leu Ala Pro Thr Gly Met Phe Ile Ala Gly Ala Lys Tyr Met
65 70 75

Val Leu Gln Gly Glu Pro Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly
80 85 90

Ala Gly Gly Ile Cys Ile Lys Lys Thr Gly Gln Ala Met Ile Met
95 100 105

Gly Ile Tyr Asp Glu Pro Val Ala Pro Gly Gln Cys Asn Met Val
110 115 120

Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu
125

26. Información de SEQ ID NO: 25 :

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 390

(b) Tipo: ácido nucléico

(c) Topología: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm

(iii) Origen:

(a) Organismo: Helianthus annuus

(b) Tejido: polen

(iv) Características: 1-390 parte de la región codificante de HaPRO5

(v) Descripción: SEQ ID NO: 25:

ATGTCGTGGC AGACGTACGT CGATGAACAC TTGATGTGCG ACATTGAAGG 50

TACTGGCCAG CATCTCACAC CTGCCGCTAT TCTCGGTCTC GACGGTACTG 100

TATGGGCTCA GAGCGCTAAG TTTCCACAGT TTAAACCTGA GGAGATGAAA 150

GGCATCATTA AGGAATTCGA CGAAGCTGGT ACTCTTGCTC CAACAGGTAT 200
GTTCATCGCG GGTGCAAAAT ATATGGTACT CCAAGGAGAG CCTGGAGCTG 250
TTATCCGTGG AAAGAAGGGA GCTGGAGGAA TATGCATCAA GAAAACGGGC 300
CAAGCTATGA TTATGGGAAT TTACGACGAG CCCGTTGCTC CTGGACAATG 350
CAACATGGTT GTTGAGAGGC TCGGTGACTA CCTCTAATGA 390

27. Información de SEQ ID NO: 26 :

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 128

(b) Tipo: aminoácido

(c) Topología: lineal

(ii) Tipo de molécula: péptido

(iii) Origen:

(a) Organismo:Helianthus annuus

(b) Tejido: polen

(iv) Características: secuencia parcial del péptido Ha-PRO5

(v) Descripción: SEQ ID NO: 26:

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile
5 10 15

Glu Gly Thr Gly Gln His Leu Thr Pro Ala Ala Ile Leu Gly Leu
20 25 30

Asp Gly Thr Val Trp Ala Gln Ser Ala Lys Phe Pro Gln Phe Lys
35 40 45

Pro Glu Glu Met Lys Gly Ile Ile Lys Glu Phe Asp Glu Ala Gly
50 55 60

Thr Leu Ala Pro Thr Gly Met Phe Ile Ala Gly Ala Lys Tyr Met
65 70 75

Val Leu Gln Gly Glu Pro Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly
80 85 90

Ala Gly Gly Ile Cys Ile Lys Lys Thr Gly Gln Ala Met Ile Met
95 100 105

Gly Ile Tyr Asp Glu Pro Val Ala Pro Gly Gln Cys Asn Met Val
110 115 120

Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu
125

28. Información de SEQ ID NO: 27 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 390
(b) Tipo: ácido nucléico
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm
(iii) Origen:
(a) Organismo: Helianthus annuus
(b) Tejido: polen
(iv) Características: 1-390 parte de la región codificante de HaPRO6
(v) Descripción: SEQ ID NO: 27:

ATGTCGTGGC AGACGTACGT CGATGAACAC TTGATGTGCG ACATTGAAGG 50
TACTGGCCAG CATCTCACAT CTGCCGCTAT TCTCGGTCTC GACGGTACTG 100
TTTGGGCTCA GAGCGCTAAG TTTCCACAGT TTAAACCTGA GGAGATGAAA 150
GGCATCATTA AGGAATTCGA CGAAGCTGGT ACTCTTGCTC CAACAGGTAT 200
GTTCATCGCG GGTGCAAAAT ATATGGTACT CCAAGGAGAG CCTGGAGCTG 250
TTATCCGTGG AAAGAAGGGA GCTGGAGGAA TATGCATCAA GAAAACGGGC 300
CAAGCTATGA TTATGGGAAT TTACGACGAG CCCGTTGCTC CTGGACAATG 350
CAACATTGTT GTTGAGAGGC TCGGTGACTA CCTCTAATGA 390

29. Información de SEQ ID NO: 28 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 128
(b) Tipo: aminoácido
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: péptido
(iii) Origen:

(a) Organismo:Helianthus annuus

(b) Tejido: polen

(iv) Características: secuencia parcial del péptido Ha-PRO6

(v) Descripción: SEQ ID NO: 28:

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile
5 10 15

Glu Gly Thr Gly Gln His Leu Thr Ser Ala Ala Ile Leu Gly Leu
20 25 30

Asp Gly Thr Val Trp Ala Gln Ser Ala Lys Phe Pro Gln Phe Lys
35 40 45

Pro Glu Glu Met Lys Gly Ile Ile Lys Glu Phe Asp Glu Ala Gly
50 55 60

Thr Leu Ala Pro Thr Gly Met Phe Ile Ala Gly Ala Lys Tyr Met
65 70 75

Val Leu Gln Gly Glu Pro Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly
80 85 90

Ala Gly Gly Ile Cys Ile Lys Lys Thr Gly Gln Ala Met Ile Met
95 100 105

Gly Ile Tyr Asp Glu Pro Val Ala Pro Gly Gln Cys Asn Ile Val
110 115 120

Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu
125

30. Información de SEQ ID NO: 29 :

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 420

(b) Tipo: ácido nucléico

(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm
(iii) Origen:
(a) Organismo: Mercurialis annua
(b) Tejido: polen
(iv) Características: 1-420 región codificante de MaPRO1
(v) Descripción: SEQ ID NO: 29:

ATGTCGTGGC AGACGTACGT CGACGACCAT TTGATGTGCG ACATTGATGG 50
ACAAGGCCAG CATCTCGCCG CTGCTTCCAT TGTTGGCCAC GACGGTAGCA 100
TTTGGGCTCA GAGCGCCTCT TTTCCTCAGT TGAAACCAGA GGAGATCACC 150
GGCATTATGA AGGATTTTGA TGAGCCAGGT CATCTTGCTC CTACAGGCTT 200
GTACATTGCA GGCACAAAAT ATATGGTTAT CCAGGGCGAA AGTGGCGCTG 250
TAATCCGTGG AAAGAAGGGA TCGGGAGGGA TCACTATAAA GAAAACTGGC 300
CAAGCTCTTG TGTTCGGAAT CTACGAGGAG CCGGTAACTC CGGGACAGTG 350
CAACATGGTG GTTGAGAGGC TCGGTGACTA CCTCATAGAA CAAGGCATGT 400
AA 402

31. Información de SEQ ID NO: 30 :

(i) Características de la secuencia:
(a) Longitud: 133
(b) Tipo: aminoácido
(c) Topología: lineal
(ii) Tipo de molécula: péptido
(iii) Origen:
(a) Organismo: Mercurialis annua
(b) Tejido: polen
(iv) Características: secuencia parcial del péptido Ma-PRO1
(v) Descripción: SEQ ID NO: 30:

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Asp His Leu Met Cys Asp Ile
5 10 15

Asp Gly Gln Gly Gln His Leu Ala Ala Ala Ser Ile Val Gly His
20 25 30

Asp Gly Ser Ile Trp Ala Gln Ser Ala Ser Phe Pro Gln Leu Lys
35 40 45

Pro Glu Glu Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Asp Glu Pro Gly
50 55 60

His Leu Ala Pro Thr Gly Leu Tyr Ile Ala Gly Thr Lys Tyr Met
65 70 75

Val Ile Gln Gly Glu Ser Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly
80 85 90

Ser Gly Gly Ile Thr Ile Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Phe
95 100 105

Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val
110 115 120

Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Ile Glu Gln Gly Met
125 130

REIVINDICACIONES

1. Moléculas de ADN recombinante caracterizadas porque codifican para un polipéptido que tiene al menos un epitopo del alérgeno profilina, de plantas seleccionadas del grupo formado por *Cynodon dactylon, Phleum pratense, Parietaria judaica, Helianthus annuus, Olea europaea y Mercurialis annua.*

2. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, caracterizada por ser un fragmento de 396 nucleótidos de ADNc proveniente de ARNm de *Cynodon dactylon* con la SEQ ID NO:1.

3. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, caracterizada por ser un fragmento de 396 nucleótidos de ADNc PpPRO3 proveniente de ARNm de *Phleum pratense* con la SEQ ID NO: 3.

4. Molécula de ADN recombinante según la reivindación 1, caracterizada por ser un fragmento de 399 nucleótidos de ADNc PjPRO1 proveniente de ARNm de *Parietaria judaica* con la SEQ ID NO: 9.

5. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, caracterizada por ser un fragmento de 405 nucleótidos de ADNc OePRO1 proveniente de ARNm de *Olea europaea* con la SEQ ID NO: 11.

6. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, caracterizada por ser un fragmento de 402 nucleótidos de ADNc HaPRO2 proveniente de ARNm de *Helianthus annuus* con la SEQ ID NO: 19.

7. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, caracterizada por ser un fragmento de 402 nucleótidos de ADNc MaPRO1 proveniente de ARNm de *Mercurialis annua* con la SEQ ID NO: 29.

8. Moléculas polipeptídicas de alérgenos profilínicos recombinantes útiles para el diagnóstico y tratamiento convencional de alergias polínicas, caracterizadas porque contienen al menos un epítopo del alérgeno profilina de

plantas seleccionadas del grupo formado por *Cynodon dactylon, Phleum pratense, Parietaria judaica, Helianthus annuus, Olea europaea y Mercuralis annua*.

9. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 16, caracterizada por ser unfragmento de 132 aminoácidos proveniente de la SEQ ID NO: 1 de *Cynodon dactylon*, correspondiente a la SEQ ID NO: 2.

10. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicacion 16, caracterizada por ser un fragmento de 131 aminoácidos proveniente de la traducción de la SEQ ID NO: 3 (ADNc PpPRO3) de *Phleum pratense*, correspondiente a la SEQ ID NO: 4.

11. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 16, caracterizada por ser un fragmento de 132 aminoácidos proveniente de la traducción de la SEQ ID NO: 9 (ADNc PjPRO1) de *Parietaria judaica*, correspondiente a la SEQ ID NO: 10.

12. Molécula polilpeptídica recombinante, según la reivindicación 16, caracterizada por ser un fragmento de 134 aminoácidos proveniente de la traducción de la SEQ ID NO: 11 (ADNc OePRO1) de *Olea europaea*, correspondiente a la SEQ ID NO: 12.

13. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 16, caracterizada por ser un fragmento de 133 aminoácidos proveniente de la traducción de la SEQ ID NO: 19 (ADNc HaPRO2) de *Helianthus annuus*, correspondiente a la SEQ ID NO: 20.

14. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 16, caracterizada por ser un fragmento de 134 aminoácidos proveniente de la traducción de la SEQ ID NO: 29 (ADNc MaPRO1) de *Mercurialis annua*, correspondiente a la SEQ ID NO: 30.

15. Un vehículo microbiano de expresión en un organismo hospedador transformado que sea autorreplicable y sirva para expresar el ADN de las reivindicaciones 1 a 7 para

producir los polipéptidos indicados en las reivindicaciones 8 a 14.

16. Un organismo hospedador, tanto eucariota como procariota, transformado con el vehículo de expresión capaz, en dicho organismo, de autorreplicable y sirva para expresar el ADN de las reivindicaciones 1 a 7 para producir los polipéptidos indicados en la reivindicaciones 8 a 14.

17. Un organismo hospedador según la reivindicación 16, que puede ser *Escherichia coli*.

18. Un método para producir un polipéptido que contenga al menos un epítopo de los alérgenos profilínicos, que implique el cultivo del organismo hospedador conteniendo el vehículo de expresión microbiano, que en el organismo mencionado se autorreplique y sirva para expresar el ADN de las reivindicaciones 1 a 7.

19. Un preparado que contenga un polipéptido con al menos un epítopo de los alérgenos profilínicos mencionados y producido por el método según la reivindicación 18.

20. Un preparado que contenga un polipéptido con al menos un epítopo de los alérgenos profilínicos mencionados y producido por síntesis química según las secuencias SEQ ID Nos: 2, 4, 10, 12, 20 y 30.

21. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 14 para el diagnóstico *in vitro* de alergias.

22. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 14 para la producción de vacunas destinadas al tratamiento convencional de alergias.

23. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 14, para la producción de péptidos que constituyen epítopos de células T capaces de actuar como vacunas con actividad anergizante (supresora de la respuesta Th2).

24. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 14, para la producción de isoformas re-

combinantes mutantes que no den lugar a fijación de IgE para el tratamiento de alergias con reducida capacidad de producción de efectos adversos.

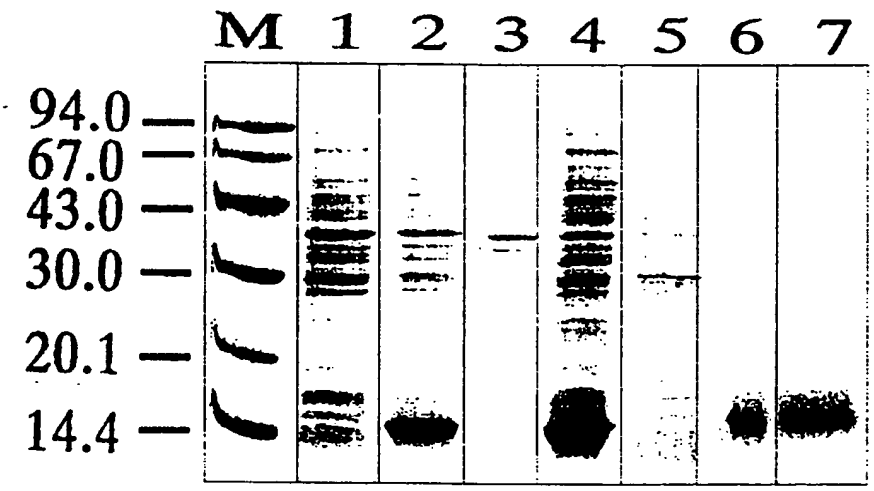


FIG.1

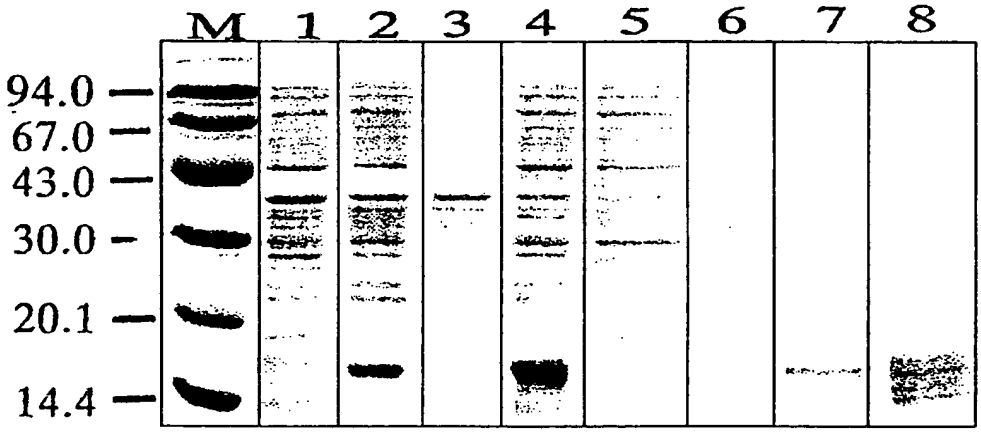


FIG.2

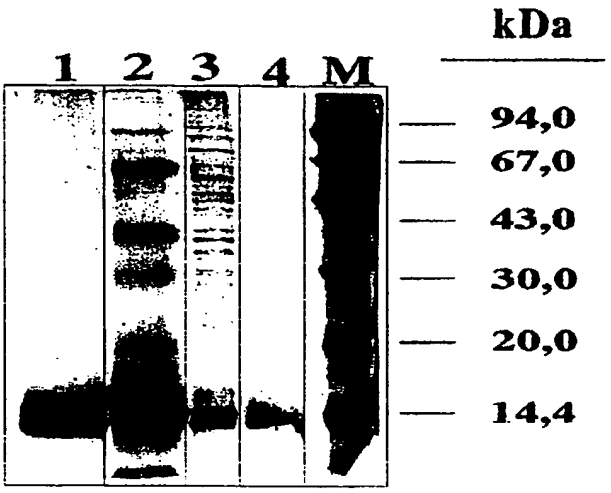


FIG.3

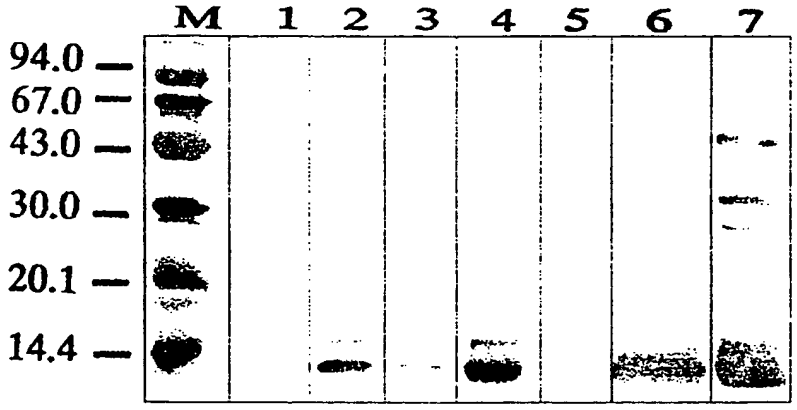


FIG.4

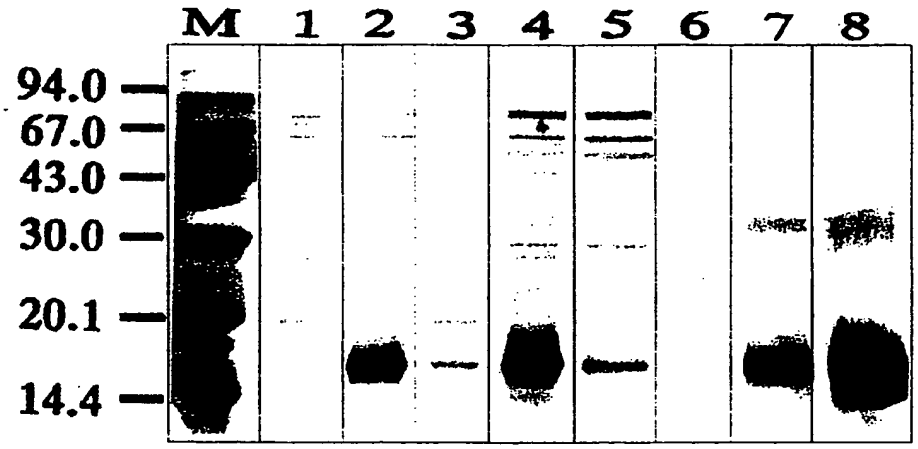


FIG.5

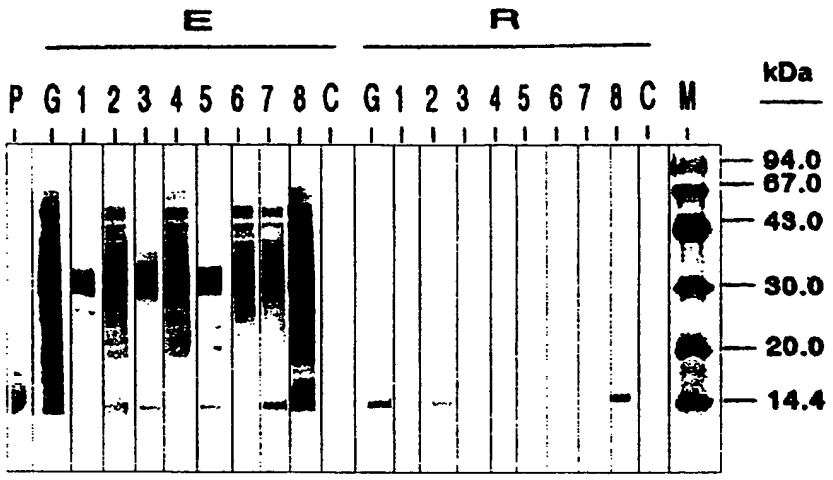


FIG. 6

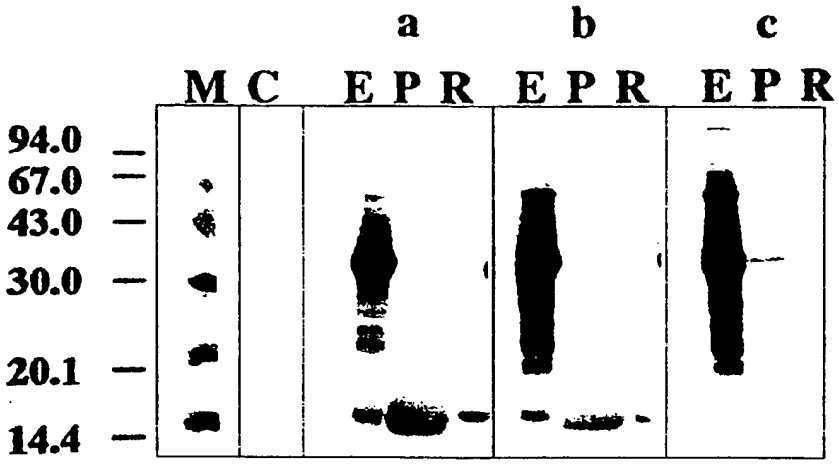


FIG.7

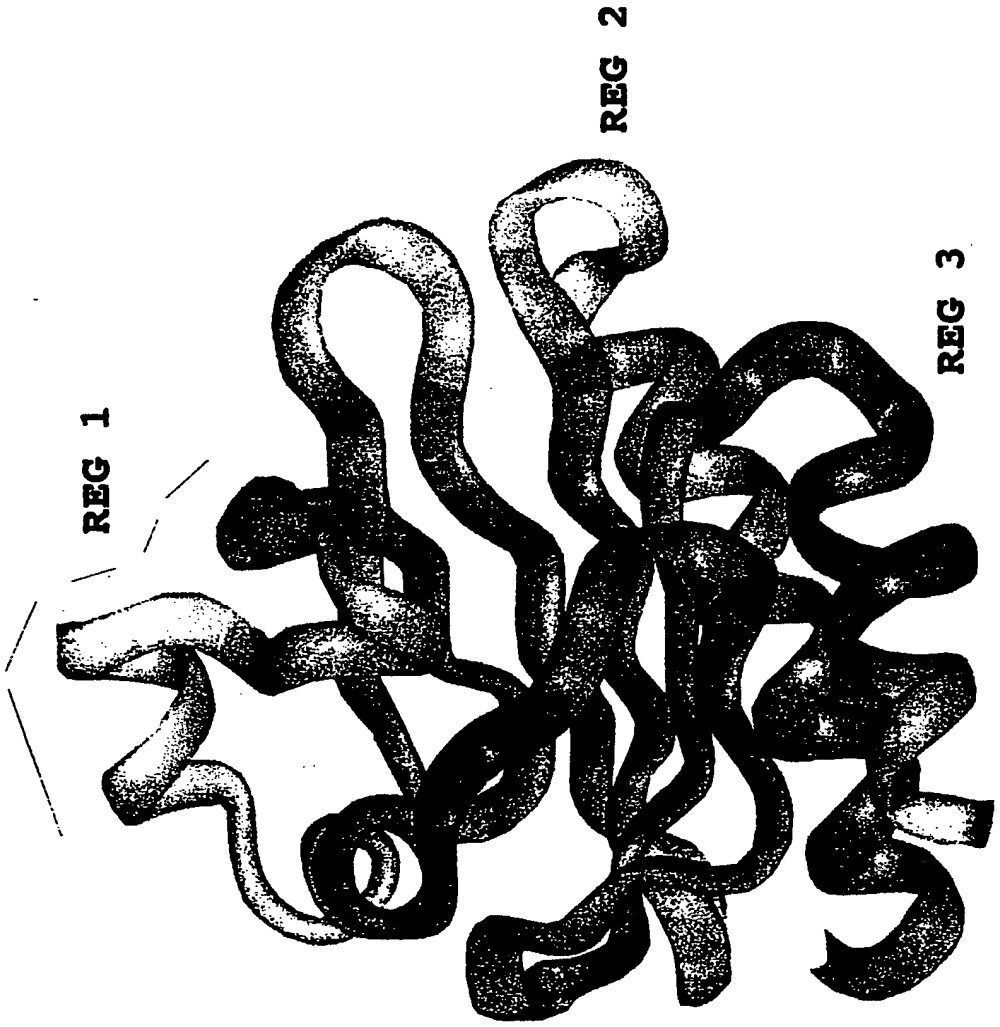


FIG.8

	Péptido II (11→21)	Péptido I (55→70)	Péptido III (106→115)
Phleum pratense	MCEIEGH HLAS.....	EPGHLAPTGMFVAGAK.....	.DEPMTPGQCN
Cynodon dactylon	------- --T-	---F-----L-L-PT-	----------
Parietaria judaica	--DVD-N T---	-A-F-----L-LG-T-	----------
Helianthus annuus	--D---TGQ --T-	-A-T--------I----	---VA-----
Olea europaea	--D----EGHR-TA	----------LHLG-T-	E--V------

FIG.9

SDS-PAGE Girasol

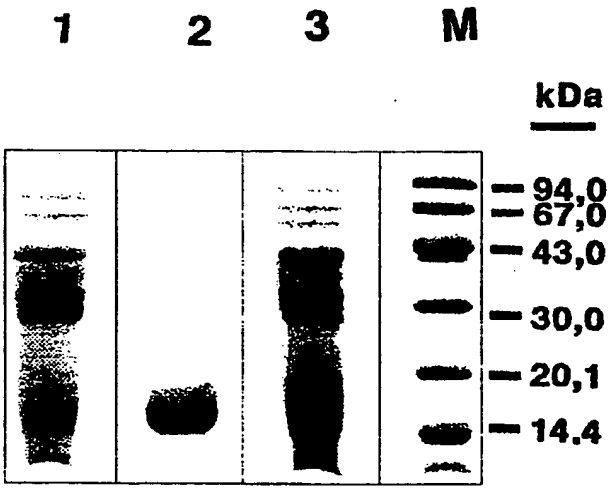


FIG.10

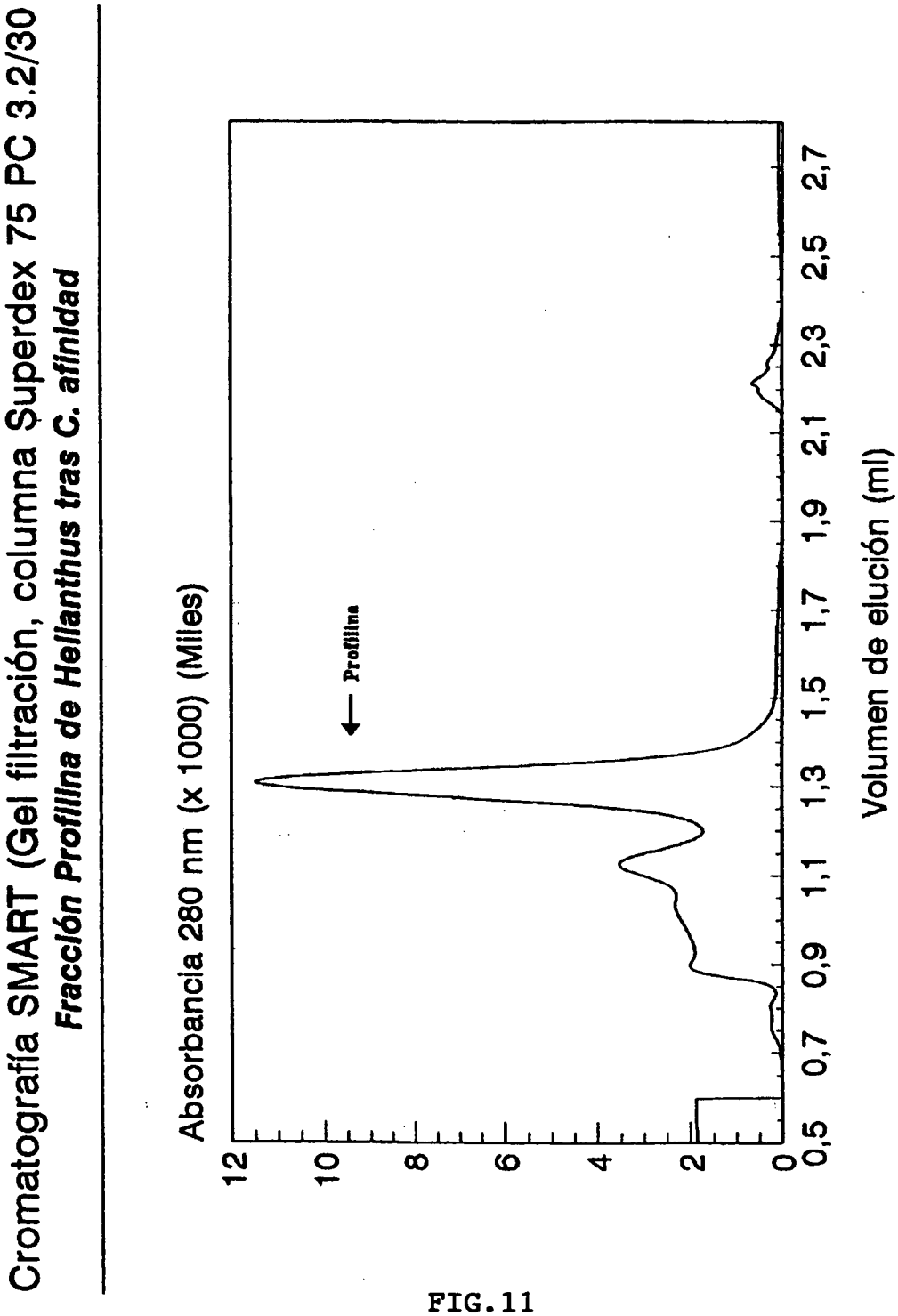

Cromatografía SMART (Gel filtración, columna Superdex 75 PC 3.2/30
Fracción Profillina de Hellanthus tras C. afinidad
Absorbancia 280 nm (x 1000) (Miles)
Profillina
Volumen de elución (ml)
12
10
8
6
4
2
0
0,5
0,7
0,9
1,1
1,3
1,5
1,7
1,9
2,1
2,3
2,5
2,7

FIG.11

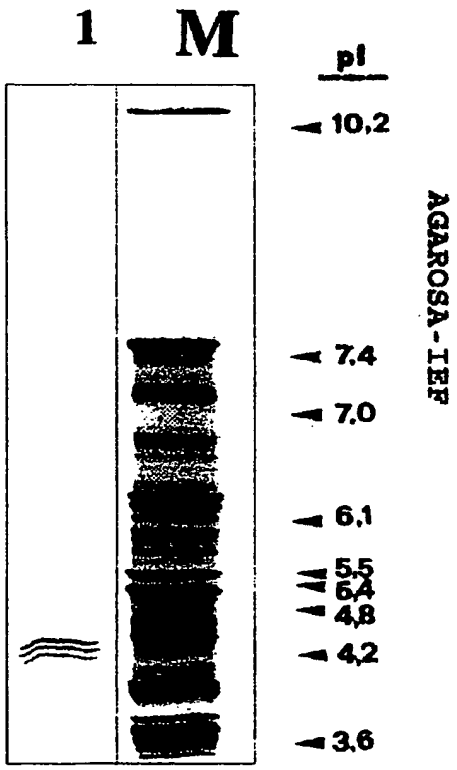


FIG.12

```
      1                                                  50
G217  MSWQAYVDEH LMCDIEGTGQ HLTSAAILGL DGTVWAQSAK FPQFKPEEMK
G221  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
  G4  ---------- ---------H ---------- ---------- ----------
  G8  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
  G2  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
  G6  ---------- ---------- ---P------ ---------- ----------
                                                  **********

      51                                                 100
G217  GIIKEFDEAG TLAPTGMFIA GAKYMVLQGE PGAVIRGKKG AGGICIKKTG
G221  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
  G4  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
  G8  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
  G2  ----G----- ---------- ---------- ---------- ----------
  G6  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
       ***G** *  **** *        ******* ******
           *Q*** *******T* *Q*****I*** ******
           **AP* H**W*

      101                                 133
G217  QAMIMGIYDE PVAPGQCNMV VERLGDYLLE QGM
G221  ---------- ---------- ---------- ---
  G4  ---------- ---------- ---------
  G8  ---------- ---------I- ---------
  G2  ---------- ---------- ---------
  G6  ---------- ---------- ---------
```

FIG.13

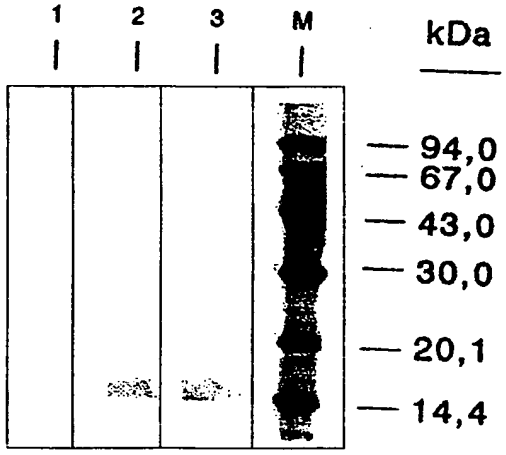


FIG.14

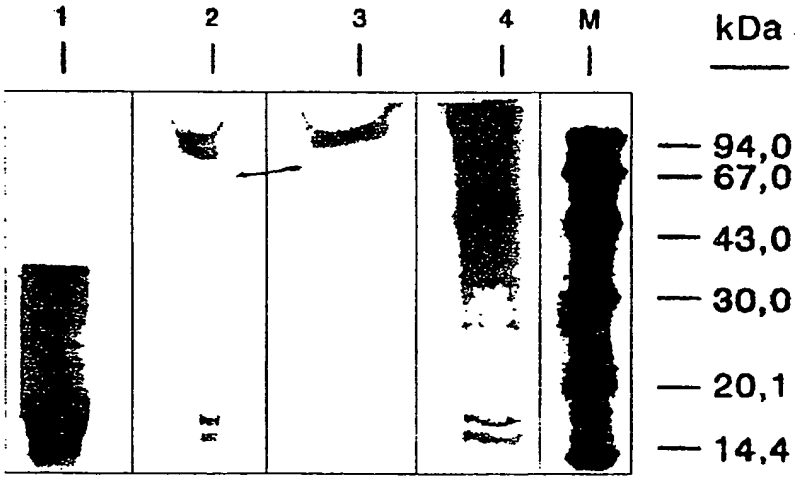


FIG.15

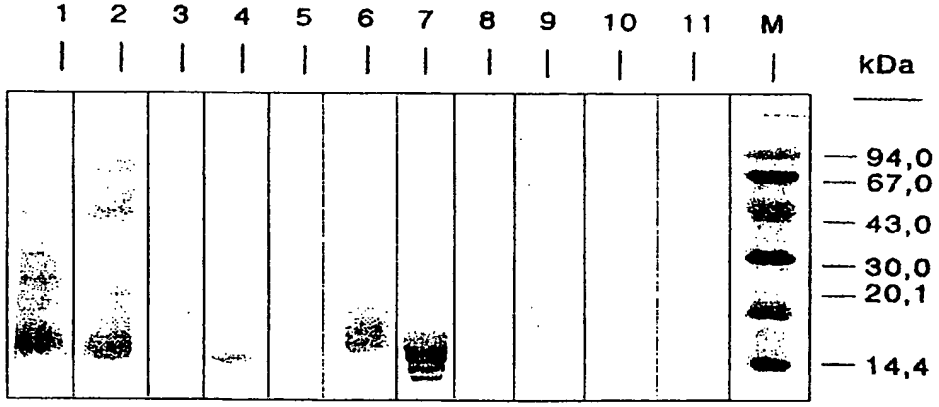


FIG.16

PCT ES 98 / 00175

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	198.061	Solicitud internacional nº	PCT/ES98/00175

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

REC'D 01 JUL 1998
W.I.P.O. PCT

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción
página 12 línea 12

B. **IDENTIFICACION DEL DEPOSITO** Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria ☐

Nombre de la institución de depósito
COLECCION ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO

Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país)
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas/UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Campus de Burjasot
46100 BURJASOT
Valencia

Fecha de depósito	nº de orden
29 de abril de 1997	CECT 4872

C. **INDICACIONES SUPLEMENTARIAS** (en caso necesario) Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos ☐

D. **ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES**
(caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)

E. **INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO** (en caso necesario)

Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")

Reservado a la oficina receptora	Reservado a la Oficina internacional
☒ Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional	☐ Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

PCT/ E S 98 / 0 0 1 7 5

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	198.061	Solicitud internacional nº	PCT/ES98/00175

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción
página 12 ,línea 13

B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria ☐

Nombre de la institución de depósito
COLECCION ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO

Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país)
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas/UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Campus de Burjasot
46100 BURJASOT
Valencia

Fecha de depósito	nº de orden
29 de abril de 1997	CECT 4873

C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario) Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos ☐

D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES
(caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)

E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en caso necesario)

Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")

Reservado a la oficina receptora	Reservado a la Oficina internacional
☒ Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional	☐ Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (Julio 1992)

PCT ES 98 / 00175

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	198.061	Solicitud internacional nº	PCT/ES98/00175

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción
página 12 ,línea 14

B. **IDENTIFICACION DEL DEPOSITO** Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria ☐

Nombre de la institución de depósito

COLECCION ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO

Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país)

Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas/ UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Campus de Burjasot
46100 BURJASOT
Valencia

Fecha de depósito	29 de abril de 1997	nº de orden	CECT 4874

C. **INDICACIONES SUPLEMENTARIAS** (en caso necesario) Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos ☐

D. **ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES**
(caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)

E. **INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO** (en caso necesario)

Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")

Reservado a la oficina receptora	Reservado a la Oficina internacional
☒ Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional	☐ Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (Julio 1992)

PCT E S 98 / 00175

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	198.061	Solicitud internacional nº	PCT/ES98/00175

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción
página 12 ,línea 15

B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria ☐

Nombre de la institución de depósito
COLECCION ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO

Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país)
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas/UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Campus de Burjasot
46100 BURJASOT
Valencia

Fecha de depósito	29 de abril de 1997	nº de orden	CECT 4875

C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario) Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos ☐

D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES
(caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)

E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en caso necesario)

Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")

Reservado a la oficina receptora	Reservado a la Oficina internacional
☒ Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional	☐ Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (Julio 1992)

PCT ES 98 / 00175

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	198.061	Solicitud internacional nº	PCT/ES98/00175

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción
página 12 ,línea 16

B. **IDENTIFICACION DEL DEPOSITO** Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria ☐

Nombre de la institución de depósito

COLECCION ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO

Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país)

Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas/UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Campus de Burjasot
46100 BURJASOT
Valencia

Fecha de depósito	nº de orden
29 de abril de 1997	CECT 4876

C. **INDICACIONES SUPLEMENTARIAS** (en caso necesario) Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos ☐

D. **ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES**
(caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)

E. **INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO** (en caso necesario)

Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")

Reservado a la oficina receptora	Reservado a la Oficina internacional
☒ Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional	☐ Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (Julio 1992)

PCT ES 98 / 00175

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	198.061	Solicitud internacional nº	PCT/ES98/00175

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción
página 12 línea 17

B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria ☐

Nombre de la institución de depósito
COLECCION ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO

Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país)
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas/UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Campus de Burjasot
46100 BURJASOT
Valencia

Fecha de depósito	nº de orden
29 de abril de 1997	CECT 4877

C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario) Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos ☐

D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES
(caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)

E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en caso necesario)

Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")

Reservado a la oficina receptora	Reservado a la Oficina internacional
☒ Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional	☐ Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (Julio 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 98/00175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: C12N 15/29, 15/70, C07K 14/415, G01N 33/53, A61K 39/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: C12N, C07K, G01N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT,, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, CA, EMBASE, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ASTURIAS, J.A. et al., "Recombinant DNA technology in Allergology: cloning and expression of plant profilins", ALLERGOLOGIA ET IMMUNOPHATOLOGIA, 1997, Vol. 25, No 3, pages 127-134 the whole document	1-24
X	VALENTA, R. Et al., "cDNA cloning and expression of timothy grass (Phleum pratense) pollen profilin in Escherichia coli: comparison with birch pollen profilin", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1994, Vol. 199, No 1, pages 106-118 the whole document	1,3,8,10,15-24

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 September 1998 (23.09.98)	28 September 1998 (28.09.98)
Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 98/00175

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ARILLA, M.C. et al. "Production and characterization of profilin monoclonal antibodies", ALLERGOLOGIA ET IMMUNOPHATOLOGIA", 1997, Vol. 25, No 3, pages 145-151 the whole document	8-14, 20-24
X	VALLVERDU, A. et al. "Mercurialis annua: characterization of main allergens and cross-reactivity with other species", INT. ARCH. ALLERGY IMMUNOL., 1997, Vol. 112, pages 356-364 the whole document	14, 20-24
A	WO 9203551 A (BIOMAYBIOTECHNIK PRODUKTIONS UND HANDELSGESELLSCHAFT) 05 March 1992 (05.03.92) the whole document	1-24
P,X	ASTURIAS, J.A. et al. "Cloning and high level expression of Cynodon dactylon (Bermuda grass) pollen profilin (Cynd 12) in Escherichia coli: purification and characterization of the allergen", CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, 1997, Vol. 27, pages 1307-1313 the whole document	1,2,8,9, 15-24
P,X	ASTURIAS, J.A. et al. "Sequence polymorhism and structural analysis of timothy grass pollen profilin allergen (Phl p11) ", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 1997, Vol. 1352, pages 253-257 the whole document	1,3,8,10, 15-24
P,X	ASTURIAS, J.A. et al. "Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen", J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL., 1997, Vol. 100, No 3, pages 365-372 the whole document	1,5,8,11, 15-24
P,X	VALLVERDU, A. Et al. "Characterization of recombinant Merculialis annua major allergen Mer a 1 (profilin)", J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL., 1998, Vol. 101, No. 3, pages 363-370	1,7,8, 14-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/ ES 98/00175

Patent document cited in search report	Publication date	Patent familiy member(s)	Publication date
WO 9203551 A	05.03.92	FI 921600 A	10.04.92
		US 5648242 A	15.07.97
		AT 401180 B	25.07.96
		AT 400198 B	25.10.95
		US 5583046 A	10.12.96
		EP 0495064 A	22.07.92
		CA 2067182 A	14.02.92
		AU 8390191 A	17.03.92
		AU 659609 B	25.05.95
		AT 168590 A	15.11.95
		AT 74094 A	15.02.95
		JP 5502589 T	13.05.93

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 98/00175

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP[6] C12N 15/29, 15/70, C07K 14/415, G01N 33/53, A61K 39/36
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP[6] C12N, C07K, G01N, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT,, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, CA, EMBASE, STRAND

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	ASTURIAS, J.A. et al., "Recombinant DNA technology in Allergology: cloning and expression of plant profilins", ALLERGOLOGIA ET IMMUNOPHATOLOGIA, 1997, Vol. 25, No 3, págs. 127-134 Todo el documento	1-24
X	VALENTA, R. Et al., "cDNA cloning and expression of timothy grass (Phleum pratense) pollen profilin in Escherichia coli: comparison with birch pollen profilin", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1994, Vol. 199, No 1, págs. 106-118 Todo el documento	1,3,8,10,15-24

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
23 Septiembre 1998 (23.09.98)	28 SEP 1998 (28.09.98)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. nº de fax +34 91 3495304	Funcionario autorizado José Luis Vizán nº de teléfono + 34 91 349 5524

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (julio 1998)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 98/00175

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	ARILLA, M.C. et al. "Production and characterization of profilin monoclonal antibodies", ALLERGOLOGIA ET IMMUNOPHATOLOGIA", 1997, Vol. 25, No 3, págs. 145-151 Todo el documento	8-14, 20-24
X	VALLVERDU, A. et al. "Mercurialis annua: characterization of main allergens and cross-reactivity with other species", INT. ARCH. ALLERGY IMMUNOL., 1997, Vol. 112, págs. 356-364. Todo el documento	14, 20-24
A	WO 9203551 A (BIOMAYBIOTECHNIK PRODUKTIONS UND HANDELSGESELLSCHAFT) 05.03.1992 Todo el documento	1-24
P,X	ASTURIAS, J.A. et al. "Cloning and high level expression of Cynodon dactylon (Bermuda grass) pollen profilin (Cynd 12) in Escherichia coli: purification and characterization of the allergen", CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, 1997, Vol. 27, págs. 1307-1313. Todo el documento	1,2,8,9, 15-24
P,X	ASTURIAS, J.A. et al. "Sequence polymorhism and structural analysis of timothy grass pollen profilin allergen (Phl p11) ", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 1997, Vol. 1352, pág. 253-257. Todo el documento	1,3,8,10, 15-24
P,X	ASTURIAS, J.A. et al. "Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen", J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL., 1997, Vol. 100, No 3, págs. 365-372 Todo el documento	1,5,8,11, 15-24
P,X	VALLVERDU, A. Et al. "Characterization of recombinant Merculialis annua major allergen Mer a 1 (profilin)", J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL., 1998, Vol. 101, No. 3, págs. 363-370	1,7,8, 14-24

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 98/00175

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9203551 A	05.03.92	FI 921600 A	10.04.92
		US 5648242 A	15.07.97
		AT 401180 B	25.07.96
		AT 400198 B	25.10.95
		US 5583046 A	10.12.96
		EP 0495064 A	22.07.92
		CA 2067182 A	14.02.92
		AU 8390191 A	17.03.92
		AU 659609 B	25.05.95
		AT 168590 A	15.11.95
		AT 74094 A	15.02.95
		JP 5502589 T	13.05.93